



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

Sarita Cândida Rabelo

**AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Campinas

2010

Sarita Cândida Rabelo

Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Aline Carvalho da Costa

Co-orientador: Rubens Maciel Filho

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

R112a Rabelo, Sarita Cândida
Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração / Sarita Cândida Rabelo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Aline Carvalho da Costa, Rubens Maciel Filho.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrólise enzimática. 4. Etanol. 5. Aproveitamento energético. I. Costa, Aline Carvalho da. II. Maciel Filho, Rubens. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation and optimization of pretreatments and enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse for second generation ethanol production

Palavras-chave em Inglês: Sugarcane bagasse, Pretreatment, Enzymatic hydrolysis, Ethanol, Energy use

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell, Antonio Maria Francisco Luiz Jose Bonomi, Daniel Ibraim Pires Atala, Silvia Azucena Nebra

Data da defesa: 23/04/2010

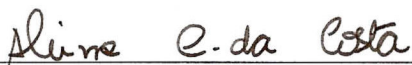
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Sarita Cândida Rabelo

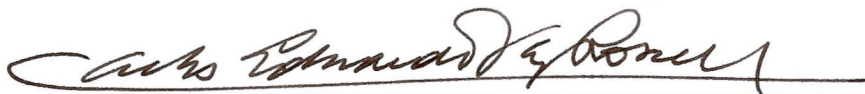
Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Aprovação em 23/04/2010



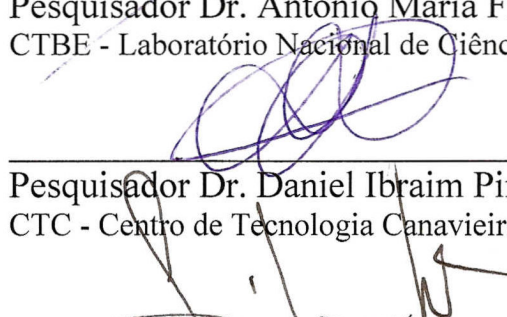
Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



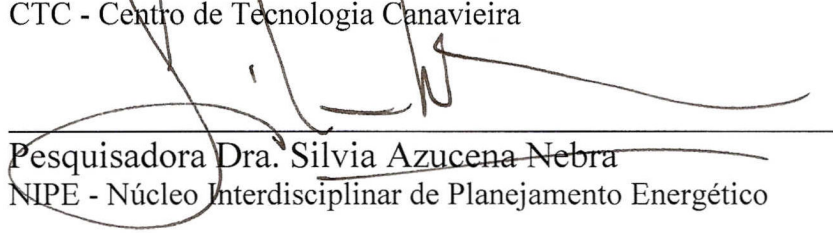
Pesquisador Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



Pesquisador Dr. Antonio Maria Francisco Luiz Jose Bonomi
CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



Pesquisador Dr. Daniel Ibraim Pires Atala
CTC - Centro de Tecnologia Canavieira



Pesquisadora Dra. Silvia Azucena Nebra
NIPE - Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético

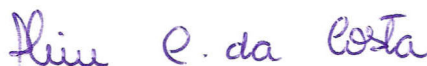
Campinas

2010

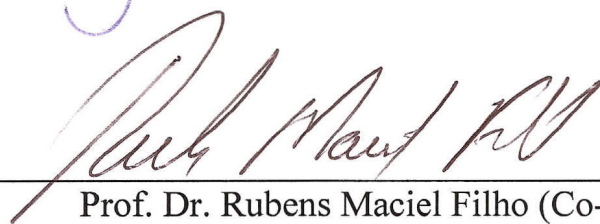
Sarita Cândida Rabelo

Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa (Orientadora)



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Co-orientador)

Campinas

2010

Dedico este trabalho ao
iluminador da minha vida, Deus,
e aos guias do meu caminho,
meus pais, João e Alda.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou saúde, força e sabedoria para vencer mais esta etapa tão sonhada de minha vida.

Aos meus pais, João e Alda, pelo amor, carinho e apoio durante a realização desse projeto de vida, e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje. Agradeço também aos meus irmãos, Aldoflávio e Ábner, pelo companheirismo e incentivo. A minha grande família, em especial minhas queridas tias e avó, que me deram apoio e principalmente apoiaram e deram suporte a minha família em um momento tão difícil.

Ao meu namorado Flávio, agradeço pelo amor, incentivo e especialmente paciência durante todos esses anos. Você sempre foi um apoio para que eu pudesse prosseguir.

A minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, e meu co-orientador, Prof. Dr. Rubens Maciel Filho, pela orientação, confiança e entusiasmo durante todo o trabalho. Mais do que orientadores vocês foram meus grandes amigos.

A todos os amigos da Faculdade de Engenharia Química (FEQ), especialmente aos do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE) e do Laboratório de Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado (LOPCA). Agradeço a Laura, Daniela, Lisa, Betânia, Sandra e Rafael pela amizade e disposição de tornar o nosso local de trabalho um ambiente agradável, palco de muito trabalho e alegrias.

Ao *Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement* do *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA), Narbonne, França. Agradeço especialmente a Dra. Hélène Carrere pela supervisão e oportunidade.

A toda equipe do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em especial ao Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell, pelo carinho e confiança.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, os meus sinceros agradecimentos.

“Quem vence sem riscos triunfa sem glórias”

Augusto Cury

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Campinas: UNICAMP, Abril. 2010. 454 fls. Projeto de Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

O grande desafio para a produção de etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. Neste trabalho o objetivo foi estudar a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Foram abordadas a otimização e comparação de dois pré-tratamentos (hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino), a otimização da carga enzimática na etapa de hidrólise e a fermentação do hidrolisado para a obtenção do etanol. Foram ainda feitas propostas para utilização dos resíduos do processo, principalmente o licor de pré-tratamento, o resíduo de hidrólise e a lignina residual precipitada. Os resultados mostram que os pré-tratamentos são efetivos para melhorar o ataque enzimático durante a etapa de hidrólise. Após otimização desta etapa foi possível obter rendimentos de globais de 51,78% e 83,41% para os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente. Em relação à etapa de otimização enzimática, foi possível converter 90,8% e 100,0% da celulose presente no material pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, com carga enzimática de 50,0 FPU/g biomassa seca pré-tratada e 25,0 CBU/g biomassa seca pré-tratada e 3,5 FPU/g biomassa seca pré-tratada e 25,0 CBU/g biomassa seca pré-tratada, respectivamente. Os hidrolisados obtidos para cada pré-tratamento não apresentaram qualquer problema em relação à fermentabilidade, obtendo-se rendimentos em etanol próximos ao estequiométrico. Estudos avaliando a produção de biogás a partir dos licores de pré-tratamento e resíduos de hidrólise mostraram que é possível conseguir bons rendimentos para os dois pré-tratamentos, sendo produzidos, na melhor condição, $180,09 \pm 6,08 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e $126,58 \pm 8,78 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. Em relação

ao resíduo de hidrólise, foram produzidos $171,51 \pm 8,72 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e $165,52 \pm 6,14 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. A lignina obtida após precipitação ácida nos licores de pré-tratamento apresentou, após análise térmica, uma entalpia superior para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio em comparação ao bagaço pré-tratado com peróxido, sendo de 67,9 J/g e 52,5 J/g, respectivamente. Desta forma, além da lignina, a utilização do biogás se torna uma complementação energética importante para o processo produtivo do etanol de segunda geração.

Palavras chaves: Bagaço de cana, pré-tratamento, hidrólise enzimática, etanol de segunda geração, aproveitamento energético

ABSTRACT

Rabelo, S. C. Evaluation and optimization of pretreatments and enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse for second generation ethanol production. Campinas: UNICAMP, April. 2010. 454 pages. Thesis Project (D.Sc. in Chemical Engineering) – Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas.

The great challenge for second generation ethanol production is the determination of the best option to render glucose available through hydrolysis of cellulose in terms of overall cost, glucose yield and fermentability of the hydrolysate. In this work the objective was to study the production of second generation ethanol from sugarcane bagasse. The topics considered included the optimization and comparison of two pretreatments (calcium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide), the optimization of the enzymatic load in the hydrolysis step and at the fermentation of the hydrolysate for ethanol production. Also, proposals were made for the use of the process residues, especially the pretreatment liquor, the hydrolysis residue and the precipitated residual lignin. The results show that the pretreatments are effective in improving enzymatic attack during the hydrolysis step. After optimization, it was possible to obtain cellulose yields of 51.78% and 83.41% for the pretreatments with calcium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide, respectively. After optimization of the enzymatic load it was possible to convert 90.8% and 100.0% of cellulose in the pretreated material with calcium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide, using enzymes loading of 50.0 FPU/g dry pretreated biomass and 25.0 CBU/g dry pretreated biomass and 3.5 FPU/g dry pretreated biomass and 25.0 CBU/g dry pretreated biomass, respectively. The hydrolysates obtained in each pretreatment did not have any fermentability difficulties, leading to ethanol yields close to the stoichiometric. Studies evaluating biogas production from the pretreatment liquor and hydrolysis residues have shown that it is possible to achieve good yields for the two pretreatments, with $180.09 \pm 6.08 \text{ Ncm}^3$ of methane/g COD for the pretreatment liquor with calcium hydroxide and $126.58 \pm 8.78 \text{ Ncm}^3$ of methane/g COD for the pretreatment liquor with alkaline hydrogen peroxide being produced in the best conditions. When the hydrolysis residue was considered $171.51 \pm 8.72 \text{ Ncm}^3$ of methane/g COD

for the bagasse pretreated residue with calcium hydroxide and $165.52 \pm 6.14 \text{ Ncm}^3$ of methane/g COD for the bagasse pretreated residue with alkaline hydrogen peroxide were produced. The lignin obtained after acid precipitation in the pretreatments liquor showed, after thermal analysis, a higher enthalpy for bagasse pretreated with calcium hydroxide compared to bagasse pretreated with peroxide, of 67.9 J/g and 52.5 J/g, respectively. Thus, in addition to the lignin, the use of biogas energy can become an important complement to the second generation ethanol production.

Keywords: Sugarcane bagasse, pretreatment, enzymatic hydrolysis, second generation ethanol, energy use

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVII
LISTA DE FIGURAS.....	XXVIII
LISTA DE TABELAS.....	XXXV
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral	5
1.1.1 Objetivos Específicos	6
1.2 Organização do Trabalho.....	8
1.3 Produção Bibliográfica.....	9
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. A Cana-de-Açúcar	14
2.2. Biomassa Lignocelulósica	18
2.2.1. Celulose	19
2.2.2. Hemicelulose	22
2.2.3. Lignina.....	24
2.2.4. Pectinas	27
2.2.5. Outras Substâncias.....	27
2.3. Estrutura e Ultraestrutura da Parede Celular Vegetal.....	28
2.4. Processo para Produção de Etanol a Partir de Materiais Lignocelulósicos	30
2.4.1. Produção de Enzimas.....	30
2.4.2. Pré-tratamento	31
2.4.2.1. Tipos de Pré-tratamento.....	34
2.4.2.1.1. Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio (Cal).....	36
2.4.2.1.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino	41
2.4.2.2. Formação de inibidores	48
2.4.3. Hidrólise da Biomassa	49
2.4.3.1. Hidrólise Enzimática	51

2.4.3.1.1. As Enzimas Celulases.....	51
2.4.3.1.2. Principais Fatores que Afetam a Hidrólise Enzimática.....	58
2.4.3.1.3. Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática.....	68
2.4.4. Processos de Fermentação dos Materiais Lignocelulósicos.....	70
2.4.4.1. Fermentação Alcoólica do Hidrolisado Enzimático.....	72
2.4.4.2. Efeito dos Inibidores na Fermentação do Hidrolisado.....	74
2.5. Aproveitamento dos Resíduos de Processo.....	77
2.5.1. Produção de Biogás.....	77
2.5.1.1. Formação do Biogás.....	78
2.5.1.2. Aspectos Microbiológicos.....	78
2.5.1.3. Fatores que Influenciam a Geração de Biogás.....	83
2.5.1.4. Tratamento do Biogás.....	87
2.5.1.5. Biofertilizante.....	88
2.5.2. Lignina como Subproduto.....	89
2.5.2.1. Aplicações da Lignina.....	90
2.6. Biorrefinaria da Cana-de-Açúcar.....	91
CAPÍTULO 3 - PREPARAÇÃO E ANÁLISE PRÉVIA DA BIOMASSA E ENZIMAS	95
3.1. Introdução.....	95
3.2. Materiais.....	96
3.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	96
3.2.2. Equipamentos.....	97
3.2.3. Biomassa lignocelulósica.....	98
3.2.4. Enzimas.....	98
3.3. Procedimento Experimental.....	99
3.3.1. Preparação e Análise da Biomassa.....	99
3.3.1.1. Secagem da Biomassa.....	99
3.3.1.2. Separação da Biomassa Seca.....	99
3.3.1.3. Caracterização Química da Biomassa.....	100
3.3.2. Determinação da Atividade Enzimática.....	100
3.3.3. Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Enzimática da Celulase.....	101
3.3.4. Métodos Analíticos para Quantificação dos Açúcares.....	101

3.3.4.1. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART).....	101
3.3.4.2. Determinação da Concentração de Glicose pelo Método GOD-PAP	102
3.3.4.3. Determinação da Concentração dos Carboidratos e Inibidores	103
3.4. Resultados e Discussões	103
3.4.1. Cálculo do Teor de Umidade do Bagaço de Cana-de-Açúcar	103
3.4.2. Análise Granulométrica.....	104
3.4.3. Análise da Composição Química do Bagaço	105
3.4.4. Atividades das Enzimas Celulase e β -Glicosidase	106
3.4.5. Efeito do pH na Atividade Enzimática	109
3.4.6. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	110
3.5. Conclusões.....	111
CAPÍTULO 4 - ESTUDO E COMPARAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULA.....	113
4.1. Introdução.....	113
4.2. Materiais	115
4.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	115
4.2.2. Equipamentos	116
4.3. Procedimento Experimental	116
4.3.1. Planejamento Experimental dos Pré-Tratamentos.....	116
4.3.1.1. Reações do Pré-Tratamento.....	117
4.3.2. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado	118
4.3.2.1. Quantificação dos Carboidratos no Hidrolisado.....	119
4.3.3. Análise dos Resultados de Pré-Tratamento e Hidrólise Enzimática	120
4.3.3.1. Cálculo de Rendimentos do Pré-tratamento, Hidrólise e Global	120
4.4. Resultados e Discussões	121
4.4.1. Planejamento Fatorial 2^3 do Pré-Tratamento com Hidróxido de Cálcio	121
4.4.1.1. Neutralização da Cal.....	122
4.4.1.1.1. Análise Estatística da Porcentagem de Cal Consumida	124
4.4.1.2. Hidrólise e Quantificação dos Açúcares para o Bagaço Pré-Tratado com Ca(OH)_2	131
4.4.1.2.1. Determinação dos Efeitos Principais e de Interação das Variáveis.....	136
4.4.1.2.1.1. Análise da Concentração de Glicose – Bagaço Não Peneirado.....	137

4.4.1.2.1.2. Análise da Concentração de Glicose – Bagaço Peneirado	145
4.4.2. Planejamento Fatorial 2^3 do Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino	152
4.5. Conclusões.....	154
CAPÍTULO 5 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO	155
5.1. Introdução.....	155
5.2. Materiais	156
5.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	156
5.2.2. Equipamentos	156
5.3. Procedimento Experimental	157
5.3.1. Otimização das Condições de Pré-Tratamento.....	157
5.4. Resultados e Discussões	158
5.4.1. Escolha da Biomassa e Condições de Otimização	158
5.4.2. Otimização do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2	159
5.4.2.1. Planejamento Composto Central para a Otimização do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2	159
5.4.2.1.1. Neutralização da Cal no Processo de Otimização do Pré-Tratamento	160
5.4.2.1.1.1. Análise Estatística do Consumo da Cal para o Planejamento Composto Central ..	162
5.4.2.1.2. Hidrólise e Quantificação dos Açúcares para o Planejamento Composto Central com Ca(OH)_2	166
5.4.2.1.2.1. Determinação dos Efeitos Principais e de Interação das Variáveis do Planejamento Composto Central para o Ca(OH)_2	171
5.4.2.1.2.1.1. Análise da Concentração de Glicose – Otimização das Condições de Pré-Tratamento com Ca(OH)_2	174
5.4.2.2. Análise das Condições Ótimas do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2	183
5.4.3. Otimização do Pré-Tratamento com H_2O_2 Alcalino.....	184
5.4.4. Análise da Composição Química do Bagaço no Processo Otimizado	187
5.5. Conclusões.....	188
CAPÍTULO 6 - ESTUDO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA ETAPA DE PRÉ-TRATAMENTO.....	190
6.1. Introdução.....	190
6.2. Materiais	191

6.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	191
6.2.2. Equipamentos	191
6.3. Procedimento Experimental	192
6.3.1. Concentração de Sólidos e Condições Operacionais.....	192
6.3.2. Reações do Pré-Tratamento e Análise da Composição Química do Material.....	193
6.3.3. Quantificação da Fração Líquida do Pré-tratamento	194
6.3.4. Hidrólise Enzimática e Quantificação do Hidrolisado	195
6.3.5. Determinação do Índice de Cristalinidade (CrI)	195
6.4. Resultados e Discussões	197
6.4.1. Análise da Composição Química	197
6.4.2. Quantificação do Licor de Pré-tratamento.....	199
6.4.3. Digestibilidade da Biomassa	200
6.4.3.1. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$	200
6.4.3.2. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado com H_2O_2	205
6.4.4. Determinação do Índice de Cristalinidade (CrI)	208
6.4.4.1. Mudança Composicional e Rendimento Global da Celulose	211
6.5. Conclusões.....	213
CAPÍTULO 7 - OTIMIZAÇÃO DA CARGA ENZIMÁTICA.....	214
7.1. Introdução.....	214
7.2. Materiais	216
7.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	216
7.2.2. Equipamentos	216
7.3. Procedimento Experimental	217
7.3.1. Otimização da Hidrólise Enzimática	217
7.4. Resultados e Discussões	218
7.4.1. Rendimentos da Hidrólise Enzimática	218
7.4.2. Análise Estatística do Rendimento de Hidrólise para a Glicose em Relação a Variação da Carga Enzimática para o Pré-Tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$	222
7.4.3. Análise Estatística do Rendimento de Hidrólise para a Glicose em Relação a Variação da Carga Enzimática para o Pré-Tratamento com H_2O_2	228
7.4.4. Otimização da Hidrólise Enzimática	233

7.5. Conclusões.....	235
----------------------	-----

CAPÍTULO 8 - ESTUDO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....237

8.1. Introdução	237
8.2. Materiais	239
8.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo	239
8.2.2. Equipamentos	240
8.3. Procedimento Experimental	241
8.3.1. Reações de Hidrólise Enzimática	241
8.3.1.1. Reações de Hidrólise Enzimática para o Processo em Batelada Alimentada	242
8.3.2. Quantificação dos Carboidratos	243
8.4. Resultados e Discussões	243
8.4.1. Efeito do Aumento da Concentração de Sólidos na Etapa de Hidrólise para o Bagaço Pré-Tratado com Hidróxido de Cálcio	243
8.4.2. Efeito do Aumento da Concentração de Sólidos na Etapa de Hidrólise para o Bagaço Pré-Tratado com Peróxido de Hidrogênio Alcalino.....	247
8.4.3. Rendimentos do Processo de Hidrólise	250
8.5. Conclusões.....	253

CAPÍTULO 9 - FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....255

9.1. Introdução	255
9.2. Materiais	257
9.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	257
9.2.2. Equipamentos	258
9.3. Procedimento Experimental	259
9.3.1. Preparação da Levedura.....	259
9.3.2. Preparação do Mosto para o Processo Contínuo	261
9.3.3. Preparação do Mosto para o Processo em Batelada	265
9.3.4. Métodos analíticos.....	266
9.3.4.1. Quantificação da Fração Líquida.....	267
9.3.4.2. Determinação da Concentração de Células Totais	267

9.4. Resultados e Discussões	267
9.4.1. Fermentação em Processo Contínuo	267
9.4.2. Fermentação em Batelada.....	278
9.5. Conclusões.....	282
CAPÍTULO 10 - PROPOSTAS PARA UTILIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DOS PROCESSOS	284
10.1. Introdução.....	284
10.2. Materiais	286
10.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo.....	286
10.2.2. Equipamentos	287
10.3. Procedimento Experimental	288
10.3.1. Produção de Biogás	288
10.3.1.1. Obtenção dos Licores de Pré-Tratamento	288
10.3.1.2. Obtenção dos Resíduos de Hidrólise Enzimática.....	289
10.3.1.3. Análise dos Licores de Pré-Tratamento e Resíduos Sólidos de Hidrólise	290
10.3.1.3.1. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	290
10.3.1.3.2. Determinação da Matéria Seca (MS) e Matéria Orgânica (MO).....	290
10.3.1.3.3. Determinação e Quantificação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV)	291
10.3.1.3.4. Quantificação dos Açúcares por Antrona.....	291
10.3.1.3.5. Determinação da Composição Química do Resíduo Sólido.....	291
10.3.1.4. Preparação dos Reatores de Biodigestão Anaeróbia	291
10.3.1.5. Volume e Composição do Biogás Produzido.....	293
10.3.2. Aproveitamento da Lignina.....	293
10.3.2.1. Obtenção da Lignina Precipitada.....	293
10.3.2.2. Determinação do Teor de Umidade.....	293
10.3.2.3. Determinação da Entalpia.....	294
10.3.2.4. Análise da Distribuição de Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	294
10.4. Resultados e Discussões	295
10.4.1. Produção do Biogás	295
10.4.1.1. Análise da DQO.....	295

10.4.1.2. Matéria Seca (MS) e Matéria Orgânica (MO).....	297
10.4.1.3. Análise dos Ácidos Graxos Voláteis e Açúcares	297
10.4.1.4. Composição Química do Biodigestor.....	299
10.4.1.5. Análise do Volume de Biogás Produzido.....	302
10.4.2. Análises para o Aproveitamento da Lignina	308
10.4.2.1. Teor de Umidade e Análise Térmica da Lignina.....	308
10.4.2.2. Análise das Ligninas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	310
10.5. Conclusões.....	312
CAPÍTULO 11 - CONCLUSÕES FINAIS.....	314
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	321
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	323
APÊNDICE I - Determinação do teor de umidade da biomassa.....	363
APÊNDICE II - Determinação da distribuição do tamanho de partícula na biomassa	365
APÊNDICE III - Determinação do teor de cinzas na biomassa.....	367
APÊNDICE IV - Determinação dos extrativos na biomassa	369
APÊNDICE V - Determinação do conteúdo de carboidratos, lignina, grupos acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural na biomassa.....	371
APÊNDICE VI - Determinação da atividade enzimática da celulase	379
APÊNDICE VII - Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase	383
APÊNDICE VIII - Efeito do pH na atividade enzimática da celulase	386
APÊNDICE IX - Efeito da temperatura na atividade enzimática da celulase.....	388
APÊNDICE X - Neutralização da cal após pré-tratamento.....	390
APÊNDICE XI - Rendimento da etapa de pré-tratamento, hidrólise e global	393
APÊNDICE XII - Determinação da DQO.....	398
APÊNDICE XIII - Determinação da matéria seca (MS) e da matéria orgânica (MO)	400
APÊNDICE XIV - Dosagem dos ácidos graxos voláteis (AGV).....	402

APÊNDICE XV - Quantificação dos açúcares utilizando antrona.....	404
APÊNDICE XVI - Determinação da composição química por Van Soest	406
APÊNDICE XVII - Determinação do volume de biogás produzido.....	411
APÊNDICE XVIII - Dosagem dos gases CO ₂ , O ₂ , N ₂ e CH ₄ por cromatografia gasosa.....	413

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fluxograma apresentando a visão do projeto destacando cada uma das etapas e seus principais produtos.	6
Figura 2.1: A cana-de-açúcar (TRIANA <i>et al.</i> , 1990).....	15
Figura 2.2: Micrografia da seção de cana (PATURAU, 1989).	16
Figura 2.3: Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede secundária) (BIDLACK <i>et al.</i> , 1992).....	18
Figura 2.4: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (FENGEL e WEGENER, 1989).....	19
Figura 2.5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal.....	21
Figura 2.6: Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semicadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação β -D (1,4) glicosídica.	22
Figura 2.7: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).	23
Figura 2.8: Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool trans-sinapílico (d), são os três precursores primários na formação da lignina no processo de polimerização desidrogenativa iniciada por enzimas (FENGEL e WEGENER, 1989).....	25
Figura 2.9: Estrutura da lignina de abeto (<i>Picea abies</i>) proposta por Adler (FENGEL e WEGENER, 1989).	26
Figura 2.10: Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25 μ m (KIRK e CULLEN, 1998).	29
Figura 2.11: Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: A vista transversal e B vista longitudinal (FENGEL e WEGENER, 1989). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.	29
Figura 2.12: Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU <i>et al.</i> , 1980).	33

Figura 2.13: Esquema representativo dos passos do pré-tratamento.....	33
Figura 2.14: Formação dos componentes inibitórios (Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b).....	48
Figura 2.15: Representação esquemática de uma celulase (CAVACO-PAULO, 1995).....	52
Figura 2.16: Estrutura tridimensional das enzimas celulolíticas. A imagem A mostra a celobiohidrolase, com o CBM, o peptídeo de união e o domínio catalítico com a forma de túnel. Na imagem B está representada a endoglicanase com o domínio catalítico com estrutura em fenda (NREL Research Review, 2003).	54
Figura 2.17: Estrutura da endoglicanase de <i>H. insolens</i> (KRAULIS, 1991).....	55
Figura 2.18: Representação esquemática do domínio catalítico CBH I de <i>T. reesei</i> (DIVNE <i>et al.</i> , 1998.).....	56
Figura 2.19: Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e BG de <i>Trichoderma reesei</i> . C define a região altamente ordenada (região cristalina), R os grupos terminais redutores (círculos preenchidos), e NR os grupos terminais não redutores (círculos não-preenchidos). Modificado de TEERI (1997).....	62
Figura 2.20: Rotas de hidrólise e fermentação (OGIER, 1999, DOMÍNGUEZ, 2003).	70
Figura 2.21: Etapas da fermentação anaeróbia para produção de metano (CNI, 1982).	82
Figura 3.1: Reação para quantificação de açúcares redutores totais por DNS.	102
Figura 3.2: Bagaço não peneirado e peneirado.....	105
Figura 3.3: Comportamento da enzima celulase.	107
Figura 3.4: Comportamento da enzima β -glicosidase.	108
Figura 4.1: Diagrama esquemático para o cálculo dos rendimentos de pré-tratamento, hidrólise e global.	120
Figura 4.2: Porcentagem da massa de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP).....	123
Figura 4.3: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida para o BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).....	127
Figura 4.4: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida para o BP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	130

Figura 4.5: Massa de bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP), solubilizada após o pré-tratamento de 4,0 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1,0 g de bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	132
Figura 4.6: Perfis de hidrólise para os ensaios do planejamento estatístico linear para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	134
Figura 4.7: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	141
Figura 4.8: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	142
Figura 4.9: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	144
Figura 4.10: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	148
Figura 4.11: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	149
Figura 4.12: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).	151
Figura 5.1: Porcentagem de cal consumida e deslignificação após pré-tratamento segundo o planejamento composto central.	161
Figura 5.2: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).	165
Figura 5.3: Porcentagem de bagaço solubilizada após o pré-tratamento de 4 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado.	167

Figura 5.4: Perfis de hidrólise dos ensaios do planejamento estatístico composto central para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.....	170
Figura 5.5: Rendimento global e porcentagem de deslignificação para cada um dos ensaios do planejamento composto central do pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$	173
Figura 5.6: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).	177
Figura 5.7: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).	179
Figura 5.8: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).	181
Figura 5.9: Perfil de hidrólise nas condições ótimas de pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$	183
Figura 5.10: Amostras do bagaço antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após hidrólise de 1,0 g nas condições ótimas do pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$	184
Figura 5.11: Amostras do bagaço antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após hidrólise nas condições ótimas do pré-tratamento com H_2O_2 alcalino (RABELO, 2007).	187
Figura 6.1: Difratoograma DRX de uma amostra de madeira (SEGAL <i>et al.</i> , 1959).	196
Figura 6.2: Concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.	202
Figura 6.3: Concentração de xilose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento....	202
Figura 6.4: Rendimento global para cada ensaio variando a concentração de sólidos no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	204
Figura 6.5: Concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.	205

Figura 6.6: Concentração de xilose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.	206
Figura 6.7: Concentração de celobiose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.	206
Figura 6.8: Rendimento global para cada ensaio variando a concentração de sólidos no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	208
Figura 6.9: Difratoograma para o bagaço bruto e pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos.	209
Figura 6.10: Difratoograma para o bagaço bruto e pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino variando a concentração de sólidos.	209
Figura 6.11: Efeito da concentração de sólidos na composição, no índice de cristalinidade corrigido e rendimento para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	212
Figura 6.12: Efeito da concentração de sólidos na composição, no índice de cristalinidade corrigido e rendimento para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	212
Figura 7.1: Rendimento global da celulose para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.	222
Figura 7.2: Perfis de hidrólise para a variação de carga enzimática da celulase e da β -glicosidase do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	224
Figura 7.3: Superfície de resposta para o rendimento de glicose variando a carga enzimática da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	227
Figura 7.4: Perfis de hidrólise para a variação de carga enzimática da celulase e da β -glicosidase do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	230
Figura 7.5: Superfície de resposta para o rendimento de glicose variando a carga enzimática da hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	232
Figura 8.1: Fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose (JORGENSEN e OLSSON, 2006).	239
Figura 8.2: Concentração de celobiose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	244

Figura 8.3: Concentração de glicose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	244
Figura 8.4: Concentração de xilose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	245
Figura 8.5: Concentração de arabinose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	245
Figura 8.6: Concentração de celobiose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. .	248
Figura 8.7: Concentração de glicose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. .	248
Figura 8.8: Concentração de xilose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	249
Figura 8.9: Concentração de arabinose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. .	249
Figura 8.10: Relação entre o rendimento de glicose e a concentração de sólidos na hidrólise...	253
Figura 9.1: Diagrama das etapas de preparo do inóculo para fermentação.	261
Figura 9.2: Fermentador Bioflo III operando em sistema contínuo.	263
Figura 9.3: Medidas na fermentação contínua do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	268
Figura 9.4: Medidas na fermentação contínua do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	269
Figura 9.5: Composição do vinho de levedurado para os produtos e subprodutos da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	271
Figura 9.6: Composição do vinho de levedurado para os produtos e subprodutos da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	272
Figura 9.7: Composição do vinho de levedurado para os compostos não fermentescíveis pela levedura <i>S. cerevisiae</i> e inibidores da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	273
Figura 9.8: Composição do vinho de levedurado para os compostos não fermentescíveis pela levedura <i>S. cerevisiae</i> e inibidores da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	274

Figura 9.9: Microscopia óptica da levedura após a etapa de fermentação com a variação da concentração do hidrolisado de hidróxido de cálcio.	276
Figura 9.10: Microscopia óptica da levedura após a etapa de fermentação com a variação da concentração do hidrolisado de peróxido de hidrogênio alcalino.	277
Figura 9.11: Fermentação em batelada para a glicose pura.	279
Figura 9.12: Fermentação em batelada para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	279
Figura 9.13: Fermentação em batelada para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	280
Figura 9.14: Comparação entre os perfis fermentativos. Na legenda (C) corresponde ao hidrolisado de bagaço pré-tratado com cal, (G) à glicose e (P) ao hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido.	280
Figura 9.15: Rendimento ao longo do processo de fermentação para cada meio.	282
Figura 10.1: Composição química do resíduo de hidrólise enzimática.	302
Figura 10.2: Composição do biogás obtido após biodigestão dos resíduos de pré-tratamento e hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	303
Figura 10.3: Composição do biogás obtido após biodigestão dos resíduos de pré-tratamento e hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	304
Figura 10.4: Volume de metano produzido em relação à DQO para os resíduos do processo de produção de etanol a partir do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	305
Figura 10.5: Volume de metano produzido em relação à DQO para os resíduos do processo de produção de etanol a partir do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	306
Figura 10.6: Volume de metano produzido em relação ao volume de licor de pré-tratamento. .	307
Figura 10.7: Volume de metano produzido em relação à massa de resíduo da hidrólise enzimática.	308
Figura 10.8: Curvas de DSC das ligninas.	309

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição do bagaço de cana-de-açúcar – valores médios internacionais (PATURAU, 1989).	17
Tabela 2.2: Diferenças entre celulose e hemicelulose (BIANCHI, 1995).....	24
Tabela 2.3: Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).....	35
Tabela 2.4: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise (HAMELINCK <i>et al.</i> , 2005).	50
Tabela 2.5: Classificação e propriedades das celulase mais abundantes em <i>T.reesei</i> (OLSSON <i>et al.</i> , 2005).....	53
Tabela 2.6: Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo (ANDERSEN, 2007).	59
Tabela 2.7: Comparação de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulose (GAN <i>et al.</i> , 2003).....	69
Tabela 2.8: Principais compostos inibitórios da etapa de fermentação de hidrolisado (adaptado de KLINKE <i>et al.</i> , 2004).....	75
Tabela 2.9: Efeito do furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético na etapa de fermentação. As porcentagens são dadas como resultado da fermentação após adição do inibidor em relação à fermentação de referência, sem adição do inibidor (adaptado de KLINKE <i>et al.</i> , 2004).....	76
Tabela 2.10: Bactérias não-metanogênicas isoladas em digestores anaeróbios (PRICE, 1981)...	81
Tabela 2.11: Concentrações e fator de inibição do processo de fermentação (CASTILHOS JUNIOR, 2000).....	86
Tabela 3.1: Reagentes utilizados nos experimentos.	97
Tabela 3.2: Porcentagem de umidade no bagaço em cada uma das etapas de secagem.	103
Tabela 3.3: Fração mássica retida após análises em triplicata.	104
Tabela 3.4: Composição química do bagaço não peneirado e peneirado.	106
Tabela 3.5: Efeito do pH na atividade enzimática.....	110
Tabela 3.6: Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	111

Tabela 4.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática.....	115
Tabela 4.2: Matriz de planejamento 2^3 com três pontos centrais para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	122
Tabela 4.3: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado.	125
Tabela 4.4: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado.	125
Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço peneirado.	128
Tabela 4.6: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço peneirado.	129
Tabela 4.7: Matriz de planejamento com os resultados da concentração dos açúcares liberados em cada um dos ensaios do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	137
Tabela 4.8: Coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.	138
Tabela 4.9: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose do bagaço não peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.	139
Tabela 4.10: Coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio..	145
Tabela 4.11: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose do bagaço peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.	146
Tabela 4.12: Matriz de planejamento com os resultados da perda de massa durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática, e a concentração dos açúcares liberados em cada um dos ensaios para o bagaço pré-tratado com H_2O_2 alcalino (RABELO, 2007).	153
Tabela 5.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos.	156
Tabela 5.2: Faixa de valores estudados no planejamento composto central para o bagaço pré-tratado com $Ca(OH)_2$ e porcentagem de deslignificação e solubilização da hemicelulose.	160

Tabela 5.3: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do planejamento composto central.	162
Tabela 5.4: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço segundo o planejamento composto central.	163
Tabela 5.5: Matriz de planejamento com os resultados das concentrações de carboidratos e rendimentos de glicose para cada um dos ensaios do planejamento composto central do pré-tratamento com Ca(OH)_2	172
Tabela 5.6: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2	174
Tabela 5.7: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2	175
Tabela 5.8: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para a concentração glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2	176
Tabela 5.9: Valores codificados e decodificados para as variáveis do pré-tratamento com Ca(OH)_2	182
Tabela 5.10: Matriz de planejamento com os resultados da concentração dos carboidratos, rendimento global de glicose e deslignificação para cada um dos ensaios do planejamento composto central para o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino (RABELO, 2007).	186
Tabela 5.11: Composição química do bagaço não peneirado antes e após cada um dos pré-tratamentos nas condições ótimas.	188
Tabela 6.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos de aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.	191
Tabela 6.2: Composição química da biomassa após pré-tratamento com Ca(OH)_2 variando a concentração de sólidos.	198
Tabela 6.3: Composição química da biomassa após pré-tratamento com H_2O_2 alcalino variando a concentração de sólidos.	198

Tabela 6.4: Composição química do licor de pré-tratamento com Ca(OH)_2 variando a concentração de sólidos.....	201
Tabela 6.5: Composição química do licor de pré-tratamento com H_2O_2 alcalino variando a concentração de sólidos.....	201
Tabela 6.6: Índices de cristalinidade (CrI) para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	210
Tabela 6.7: Índices de cristalinidade (CrI) para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	210
Tabela 7.1: Reagentes utilizados nos experimentos de otimização da carga enzimática.	216
Tabela 7.2: Fatores codificados e valores reais para a otimização da hidrólise enzimática.....	218
Tabela 7.3: Matriz de planejamento apresentando os rendimentos de glicose e xilose após hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.	219
Tabela 7.4: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2	225
Tabela 7.5: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2	225
Tabela 7.6: Análise da variância (ANOVA) para o estudo da variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2	226
Tabela 7.7: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2	230
Tabela 7.8: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2	231
Tabela 7.9: Análise da variância (ANOVA) para o estudo da variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2	232
Tabela 7.10: Rendimentos de glicose no processo de otimização enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	234
Tabela 7.11: Rendimentos de glicose no processo de otimização enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	234
Tabela 8.1: Características dos reagentes utilizados nos experimentos.	240
Tabela 8.2: Condições reacionais para o estudo do aumento da concentração de sólidos na hidrólise enzimática.....	241

Tabela 8.3: Rendimentos de glicose e xilose da etapa de hidrólise e hidrólise + pré-tratamento (global) para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.	251
Tabela 9.1: Reagentes utilizados nos experimentos.	258
Tabela 9.2: Composição do meio de ativação para cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	260
Tabela 9.3: Composição do meio de crescimento do inóculo.	260
Tabela 9.4: Composição do melaço original a 200 g/L (ANDRADE, 2007).	262
Tabela 9.5: Composição do hidrolisado obtido para cada um dos pré-tratamentos.	262
Tabela 9.6: Composição do mosto de fermentação contínua utilizando o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.	264
Tabela 9.7: Composição do mosto de fermentação contínua utilizando o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	264
Tabela 9.8: Concentração de cada componente presente no mosto do processo em batelada. ...	266
Tabela 10.1: Reagentes utilizados para etapa de pré-tratamento, separação da lignina e nos experimentos de produção de biogás.	287
Tabela 10.2: Concentração das soluções utilizadas como fonte de compostos inorgânicos para a produção de biogás.	292
Tabela 10.3: Valores de DQO para cada uma das amostras estudadas.	296
Tabela 10.4: Valores de MS e MO nos resíduos de hidrólise.	297
Tabela 10.5: Concentrações dos ácidos graxos voláteis e açúcares quantificados nos licores de pré-tratamento.	298
Tabela 10.6: Concentração das soluções nutrientes presentes no biodigestor.	300
Tabela 10.7: Quantidade de cada componente adicionado ao biodigestor para análise dos resíduos de processo do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	301
Tabela 10.8: Quantidade de cada componente adicionado ao biodigestor para análise dos resíduos de processo do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	301
Tabela 10.9: Quantidade de lignina recuperada e teor de umidade.	309
Tabela 10.10: Valores de $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$ e polidispersividade para as ligninas obtidas após precipitação no licor de pré-tratamento do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.	311

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O setor de bioenergia encontra-se diante de um grande desafio: o de comprovar e garantir sua sustentabilidade. Alternativas energéticas, por meio de fontes renováveis de energia, tem sido objeto de pesquisas no mundo inteiro, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais.

As biorrefinarias, que visam à produção de vários produtos e subprodutos como os combustíveis líquidos, produtos químicos, calor e/ou eletricidade, estão cada vez mais em foco no mercado de bioenergia (CHEN *et al.*, 2005; ZHANG, 2008). Em uma biorrefinaria lignocelulósica, a biomassa pode ser convertida em biomateriais úteis e/ou energia, de forma integrada, podendo assim, maximizar o valor econômico da biomassa utilizada, reduzindo o desperdício e se tornando um importante instrumento de mitigação de emissões de gases do efeito estufa (GEE) (SHEEHAN *et al.*, 2003; THOMSEN, 2005). Neste contexto, o Brasil apresenta-se com grandes perspectivas na implementação de biorrefinarias relacionadas à cultura da cana-de-açúcar.

Atualmente o mercado brasileiro defronta-se com a perspectiva de um aumento significativo da demanda de etanol. Esta previsão se sustenta em três realidades de mercado: aumento interno do consumo de álcool hidratado pelo sucesso da introdução da alternativa flex-fuel no mercado de veículos automotivos leves; expansão das exportações brasileiras de álcool em função do crescente interesse mundial pela mistura do etanol à gasolina, como forma de enfrentar o aquecimento global e tendo em vista os altos preços do petróleo; opção brasileira pela

produção do biodiesel utilizando etanol na transesterificação dos óleos vegetais (BONOMI, 2006).

Apesar do grande número de efeitos positivos relacionados ao consumo do etanol, existem muitas críticas em relação à possível expansão excessiva do cultivo de cana para fins de produção de combustível no Brasil, porém segundo GOLDEMBERG *et al.* (2008), as áreas adequadas para o plantio de cana no país estão limitadas às condições de solo, precipitação pluviométrica e logística, sendo que regiões como o nordeste requerem altos investimentos em irrigação. O mesmo autor cita também que ao longo dos anos não se observou decréscimo das áreas agriculturáveis para a produção de alimentos no país mesmo com o aumento do cultivo de cana. É importante ressaltar que muitas áreas possíveis para expansão são terras degradadas ou de pasto, o que não ameaça a produção de alimentos nem áreas da Floresta Amazônica. A rotação de cultura no cultivo da cana-de-açúcar permite ainda que 20% de sua área seja utilizada para alimentos.

O programa de etanol no Brasil tem substituído aproximadamente 1,5% de toda a gasolina usada no mundo. Uma visão realista projeta que mais que 10% de toda a gasolina usada no mundo possa ser substituída por biocombustíveis nos próximos 15-20 anos, levando assim à necessidade de um aumento significativo da produção do etanol brasileiro (GOLDEMBERG, 2008).

Recentemente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA) confirmou que o etanol de cana-de-açúcar é um biocombustível renovável de baixo carbono, que pode contribuir de forma significativa para a redução das emissões de gases causadores do efeito estufa. Assim, o etanol brasileiro passou a ser reconhecido mundialmente como um biocombustível avançado, capaz de reduzir as emissões de gases do efeito estufa em até 61%, quando comparado à gasolina, utilizando um prazo de compensação de 30 anos para emissões ligadas a efeitos indiretos do uso da terra (UNICA, 2010).

Em contrapartida, o governo brasileiro autorizou uma redução do teor de etanol anidro a gasolina de 25 para 20%. Esta decisão foi tomada com o objetivo de ajustar a produção de açúcar e de álcool as variações de disponibilidade da cana e da demanda do mercado (FOLHA ONLINE, 2010). O etanol anidro é misturado à gasolina A, em um teor que pode variar de 20 a 25% $\pm$ 1%

em volume, para formar a gasolina C que é comercializada nos postos, sendo este teor estabelecido pela Comissão Interministerial do Açúcar e do Alcool (CIMA).

Contudo, apesar do aumento nas vendas de etanol nos últimos três anos e do custo competitivo de produção do combustível, com baixa emissão de CO₂, o Brasil necessita de uma política de expansão para a produção do etanol, não apenas para abastecer o mercado interno como também para suprir a demanda de outros países frente às novas exigências ambientais, estimulando cada vez mais a pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para o etanol, como a biomassa lignocelulósica, e a construção destas biorrefinarias integradas.

Este importante salto na produção, que começa a se tornar realidade através da implantação de novas usinas, abrindo novas fronteiras agrícolas para a cana-de-açúcar, exigirá, paralelamente, um esforço concentrado na busca de um aumento significativo na produtividade alcançada em litros de álcool produzido por hectare-ano de cana plantada. Este aumento poderá ser alcançado através de duas rotas tecnológicas. A primeira rota tem seu foco voltado para a área agrícola e buscará, através da ampliação do atual programa de introdução de novas variedades de cana e, futuramente, através do emprego da cana transgênica, estender e, se possível potencializar o atual nível de aumento de produtividade em toneladas de cana/hectare-ano, que gira em torno de 2,5% ao ano. A segunda rota, focada no setor industrial, buscará desenvolver tecnologias que permitam o aproveitamento integral da cana-de-açúcar na produção de etanol ou outros combustíveis renováveis, agregando valor à cadeia da cana, através da produção de novos produtos (BONOMI, 2006).

A utilização de biomassa para a produção de álcool combustível pela rota química ou biológica envolve, basicamente, dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol ou outros combustíveis. Considerando a grande disponibilidade deste tipo de matéria-prima no Brasil a custos muito baixos quando comparados a outros países, esta é uma opção bastante atraente, sendo a possibilidade de obtermos resultados viáveis enorme.

O uso do bagaço como matéria prima apresenta uma série de vantagens: já vem processado das moendas; está disponível em grandes quantidades; tem custo mínimo; está pronto para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (OLIVÉRIO e HILST, 2005).

Além disso, a produção de etanol de segunda geração apresenta como grande vantagem a possibilidade de integração com o processo de primeira geração.

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa à pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise para produção de etanol. Esta etapa é responsável pela remoção de lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise.

O pré-tratamento é visto como uma das etapas mais caras do processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e por isso, apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (LEE *et al.*, 1994; LYND *et al.*, 1996; MOSIER *et al.*, 2003a, b).

Em relação à hidrólise, as rotas mais conhecidas são as que utilizam ácidos ou enzimas. Embora os processos ácidos sejam eficientes e relativamente baratos, geram vários subprodutos inibidores da fermentação, devido à degradação parcial da glicose, da fração hemicelulósica e da lignina. Ademais, os processos ácidos exigem o uso de equipamentos construídos com materiais caros para resistirem à corrosão e a altas temperaturas que correspondem eventualmente a altas pressões. Por isso, a sacarificação enzimática tem sido objeto da maior parte dos estudos hoje no mundo, uma vez que proporciona maiores rendimentos e é realizada a pressão ambiente e temperaturas moderadas (50-60°C), sem a formação de subprodutos indesejáveis, sendo ainda possível utilizar técnicas avançadas de biotecnologia para sua otimização (LEATHERS, 2003; RILEY, 2002; SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996; WYMAN, 1999). No entanto, no estágio de desenvolvimento atual, o processo ainda é economicamente inviável, o que justifica o interesse pelo estudo.

O grande desafio da produção economicamente viável do etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado, o que provavelmente possibilitará uma comercialização difundida do produto em um futuro próximo. Além disso, visa-se uma perfeita integração energética do processo, com aproveitamento de todos

os resíduos, como a hemicelulose e lignina, além de uma grande quantidade de águas residuais geradas pelo processo.

Uma alternativa para a utilização da hemicelulose e dessas águas residuais é a produção de biogás, que pode se tornar uma solução sustentável para a remoção da matéria orgânica residual nos efluentes de etanol, além da possibilidade de utilização deste novo efluente como adubo residual em solo agrícola (LIU *et al.*, 2006; TORRY-SMITH *et al.*, 2003). O biogás produzido pode suprir parte energética do processo de produção de etanol de segunda geração e liberar o bagaço, que seria utilizado na cogeração, para a produção de etanol de segunda geração. Uma opção para a lignina é utilizá-la para a produção de calor/energia através da sua queima direta em caldeiras.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar, comparando dois diferentes pré-tratamentos: hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. Além disso, foi estabelecida uma visão mais ampliada do projeto, levando em consideração além da produção do etanol, através da sua integração com o processo comercial já existente, um estudo preliminar do aproveitamento dos resíduos do processo produtivo, visando à geração de calor e/ou eletricidade, proporcionando assim, uma maior sustentabilidade no processo.

A Figura 1.1 apresenta uma visão ampla do objetivo desta tese de doutorado, relacionado a integração do processo principal com o aproveitamento dos subprodutos. O fluxograma apresenta um caso específico para este trabalho não sendo necessariamente a única forma para desenvolvimento das etapas.

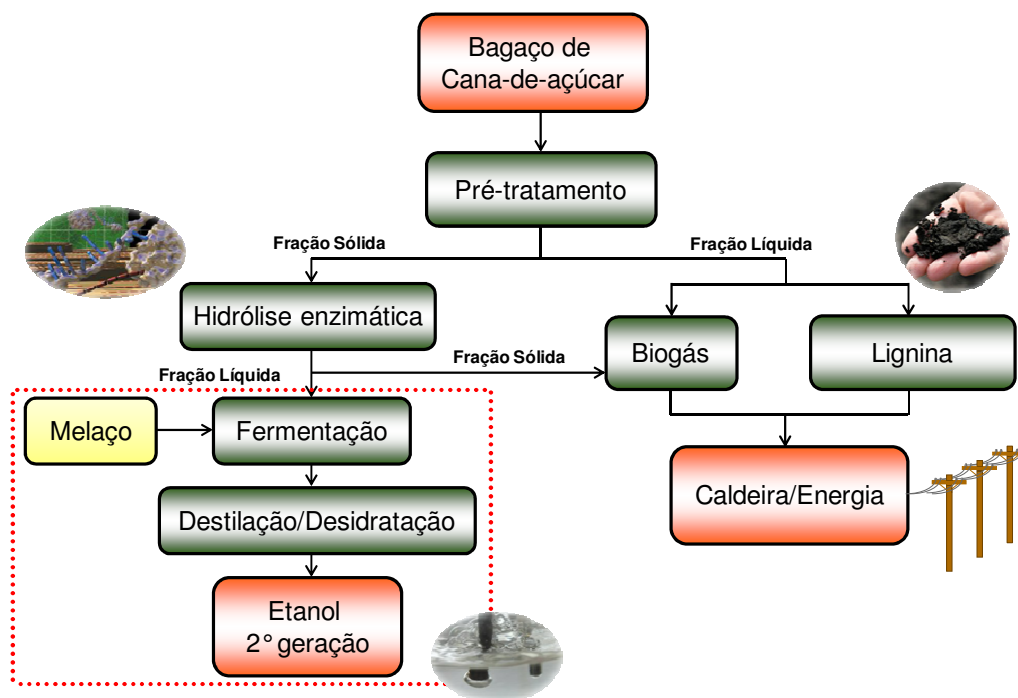


Figura 1.1: Fluxograma apresentando a visão do projeto destacando cada uma das etapas e seus principais produtos.

1.1.1 Objetivos Específicos

Os tópicos a seguir apresentam os principais passos seguidos para atingir o objetivo principal deste trabalho:

i. Estudo e comparação de dois pré-tratamentos sobre diferentes tamanhos de partículas. Foram estudadas três variáveis do processo: tempo de reação, temperatura e concentração de reagente para os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio (cal) e peróxido de hidrogênio alcalino. A influência das variáveis foi analisada quanto à eficiência em produzir açúcares no processo de hidrólise, levando em consideração principalmente a produção de glicose (açúcar fermentescível). As análises foram realizadas através do software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK). Modelos lineares ou quadráticos foram escolhidos de acordo com a necessidade de cada processo.

ii. Otimização das melhores condições reacionais e tamanhos de partícula em cada um dos pré-tratamentos. Nesta etapa, as análises foram realizadas através de modelos quadráticos (superfícies de resposta) utilizados para definir as condições que separadamente e simultaneamente maximizam as variáveis de resposta. As análises foram novamente realizadas através do software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

iii. Estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento. Nesta etapa foi testada a possibilidade de um aumento da carga de sólidos para cada um dos pré-tratamentos visando assim tornar o processo mais robusto.

iv. Execução de experimentos para determinação da carga enzimática mínima (celulase e β -glicosidase) capaz de levar a um alto rendimento do processo. Esta etapa de otimização enzimática foi realizada com o bagaço pré-tratado em cada uma das condições ótimas e os resultados analisados com a ajuda do software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

v. Estudo do aumento da carga de sólidos durante a etapa de hidrólise enzimática. Estudos foram realizados visando um aumento da carga de sólidos na hidrólise enzimática para cada um dos pré-tratamentos com as condições previamente otimizadas, levando em consideração processos em batelada e batelada alimentada.

vi. Fermentação do processo otimizado para produção do etanol. Nesta etapa foram realizadas as fermentações dos hidrolisados enzimáticos obtidos para cada um dos pré-tratamentos levando em consideração análises quanto ao teor de inibidores, principalmente furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético. A fermentação foi conduzida nas condições industriais usuais, em processos contínuos, adicionando o hidrolisado ao melaço industrial, além de fermentações em batelada com o hidrolisado puro para comprovar sua fermentabilidade.

vii. Propostas de utilização dos resíduos do processo. Foi analisada a possibilidade de utilização do licor de pré-tratamento de cada um dos processos, da fração sólida resultante após a etapa de hidrólise enzimática e da fração de lignina sólida precipitável do licor de pré-tratamento quanto à eficiência energética e possibilidade de geração de energia.

1.2 Organização do Trabalho

Esta tese de doutorado foi dividida em capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

O Capítulo 2 apresenta a “Revisão Bibliográfica”, onde são abordados a composição química da biomassa e os tipos de pré-tratamento mais utilizados, dando ênfase aos pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. Apresentam-se também, neste capítulo, os principais conceitos relacionados a hidrólise enzimática, descrevendo a forma de atuação das enzimas utilizadas. Além disso, uma revisão relacionada aos processos fermentativos e aproveitamento do resíduo industrial foi apresentada.

No Capítulo 3, “Preparação e análise prévia da biomassa e enzimas”, foi apresentada toda a metodologia empregada na separação e caracterização química do material lignocelulósico e das enzimas celulase e β -glicosidase, além dos resultados relacionados a esta preparação, tais como análise compositiva de cada biomassa estudada, análise das atividades enzimáticas e de seus efeitos sob o pH e a temperatura do meio.

No Capítulo 4, “Estudo e comparação dos pré-tratamentos sobre diferentes tamanhos de partícula”, foi apresentado um estudo inicial das condições de pré-tratamento visando à comparação de dois tamanhos de partícula: o bagaço de cana não peneirado e peneirado. Foram utilizados como agentes de pré-tratamento o hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, levando em consideração os efeitos da variável tempo reacional, temperatura e concentração do reagente em relação a eficiência em liberar os açúcares após hidrólise enzimática.

No Capítulo 5, “Otimização das condições de pré-tratamento”, foi apresentada a escolha do bagaço a ser utilizado na etapa de otimização, sendo descritas todas as análises e resultados do planejamento estatístico composto central visando à otimização dos pré-tratamentos propostos.

O Capítulo 6, “Estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento”, foi apresentado um estudo relacionado ao aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento do bagaço com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Para o Capítulo 7, “Otimização da carga enzimática”, foi apresentado um estudo visando à otimização da carga enzimática para a hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino nas condições previamente otimizadas. O intuito desta etapa foi determinar a carga enzimática mínima capaz de levar a um alto rendimento de açúcares fermentescíveis.

No Capítulo 8, “Estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de hidrólise enzimática”, foi apresentado um estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O intuito é determinar a máxima concentração de sólidos possível para entrada no reator de hidrólise sem que haja um comprometimento no andamento desta etapa e consequentemente menor liberação dos açúcares fermentescíveis.

No Capítulo 9, “Fermentação dos hidrolisados para produção de etanol de segunda geração”, foram apresentados os resultados das fermentações utilizando os hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática, nas condições otimizadas, do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, também nas condições otimizadas, através de processos contínuos e em batelada.

No Capítulo 10, “Propostas para utilização dos resíduos dos processos”, foi proposta uma separação do licor de pré-tratamento visando à obtenção, na fração solúvel, de um licor rico em açúcares não fermentescíveis e na fração insolúvel, da lignina precipitável. O objetivo, nos dois casos, é utilizar estes resíduos para a geração de energia para o processo produtivo.

E por fim, o Capítulo 11, “Conclusões finais”, apresenta um resumo dos resultados mais relevantes do trabalho.

1.3 Produção Bibliográfica

Esta Tese de Doutorado deu origem, até o momento, aos seguintes trabalhos:

Artigos completos publicados em periódicos

RIVERA, E. A. C., RABELO, S. C., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: Determining optimal enzyme loading using neural networks. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (7), 983-992, 2010.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 139-150, 2009.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144, 87-100, 2008.

Capítulo de livro publicado

RABELO, S. C., COSTA, A. C., ROSSELL, C. E. V. Aproveitamento de Resíduos Industriais, 465-486 p. In: *Fernando Santos, Aloízio Borém, Celso Caldas. (Org.). Cana-de-açúcar - Bioenergia, Açúcar e Alcool Tecnologia e Perspectivas*. Viçosa: Editora UFV, 2ª Edição, 577 p, 2009.

Depósito de patente

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Processo de pré-tratamento e hidrólise de biomassa vegetal lignocelulósica e produto para a produção industrial de álcoois*. Depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 04/07/2008-PI0802559-2, 2008.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

RABELO, S. C., GARZÓN FUENTES, L. L., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Influence of biomass concentration increase in the pretreatment stage of sugarcane bagasse in the enzymatic hydrolysis profile*. XXV Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Medellín, Colombia, 2009.

GARZÓN FUENTES, L. L., RABELO, S. C., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Alkaline and oxidative pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production*. XXV Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Medellín, Colombia, 2009.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008, Recife. Anais do XVII COBEQ, 2008.

Artigo submetido para publicação

RABELO, S. C., FONSECA, N. A. A., FUENTES, L. L. G., GARCIA, D. R., ANDRADE, R. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline. *Biomass & Bioenergy*.

FUENTES, L. L. G., RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Optimization and kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Artigos a serem submetidos

RABELO, S. C., ANDRADE, R. R., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Investigation of the fermentability of hydrolysate mixed with molasses and their impacts on bioethanol production*.

RABELO, S. C., FUENTES, L. L. G., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Enzymes loading optimization in the hydrolysis of sugarcane bagasse - a comparison between bagasse pretreatment with lime and alkaline hydrogen peroxide*.

ANDRADE, R. R., RABELO, S. C., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *A new kinetic model for the alcoholic fermentation process from hydrolysate of sugarcane bagasse pre-treated with hydrogen peroxide*.

GARCIA, D. R., RABELO, S. C., FUENTES, L. L. G., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: the influence of temperature and pretreatment duration on delignification and sugars yield.*

Resumos publicados em anais de congressos

RABELO, S. C., ANDRADE, R. R., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Investigation of the fermentability of hydrolysate mixed with molasses and their impacts on bioethanol production.* In: 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Clearwater Beach, Florida, 2010.

CONDORENA, E. G. B., FUENTES, L. L. G., RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Optimization and process dynamic modeling with neural networks of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of second generation ethanol.* In: 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Clearwater Beach, Florida, 2010.

RABELO, S. C., COSTA, A. C., MACIEL FILHO, R. *Otimização da carga enzimática da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.* In: VI Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2009.

MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C., MACIEL, M. R. W., MAUGERI FILHO, F., ATALA, D. I. P., RIVERA, E. C., DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., QUIROGA, A. G., RABELO, S. C., GARCIA, D. R., FUENTES, L. L. G., ANDRADE, R. R. *Development and optimization production of 1st and 2nd generation bioethanol.* In: Workshop on Hydrolysis Route for Cellulosic Ethanol from Sugarcane, CTBE, Campinas, 2009.

RIVERA, E. C., DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., QUIROGA, A. G., LUNELLI, B. H., RABELO, S. C., ANDRADE, R. R., FUENTES, L. L. G., RUEDA, S. M. G. *Development and optimization of the production of 1st and 2nd generation bioethanol and organic acids from sugarcane.* In: Workshop on the impact of new technologies on the sustainability of the sugarcane-bioethanol production cycle, CTBE, Campinas, 2009.

RABELO, S. C., FUENTES, L. L. G., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. . *Enzymes loading optimization in the hydrolysis of sugarcane bagasse: A comparison between*

bagasse pretreatment with lime and alkaline hydrogen peroxide. In: 31st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, San Francisco, California, 2009.

GARCIA, D. R., RABELO, S. C., FUENTES, L. L. G., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: The influence of temperature and pretreatment time on delignification and sugars yield*. In: 31st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, San Francisco, California, 2009.

FUENTES, L. L. G., GARCIA, D. R., RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Optimization and kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis*. In: 31st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, San Francisco, California, 2009.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Lime pretreatment of sugarcane bagasse for fuel bioethanol production*. In: 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, New Orleans, Louisiana, 2008.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. *Avaliação de pré-tratamentos e modelagem da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol*. In: V Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

RABELO, S. C., COSTA, A. C., MACIEL FILHO, R. *Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol combustível*. In: IV Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química, Campinas, UNICAMP, 2005.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O melhoramento na qualidade de vida da população exige uma solução para os problemas relacionados com a carência de alimentos, a escassez energética e a poluição. O aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos tem sido apresentado como uma solução alternativa que abrange o contexto destes problemas. A biomassa é uma fonte renovável de produção de energia em escala suficiente para desempenhar um papel expressivo no desenvolvimento de programas vitais de energias renováveis e na criação de uma sociedade ecologicamente mais consciente. Embora seja uma fonte de energia primitiva, seu amplo potencial ainda precisa ser explorado. Entre as biomassas lignocelulósicas, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar destacam-se no Brasil como sendo economicamente viáveis para a produção de combustíveis “ambientalmente corretos”.

2.1. A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea originária do sudeste asiático, e introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (ROSILLO-CALLE *et al.*, 2005).

Trata-se de uma planta da família Poaceae, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramas. As principais características dessa família são a forma da inflorescência

(espiga), o crescimento do caule em colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. Desde a sua origem até os dias atuais ela vem passando por modificações, o que resultou em várias espécies, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Hoje, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido multiespecífico, recebendo a designação de *Saccharum spp.* (JOAQUIM, 1997).

A cana é composta por partes subterrâneas e aéreas. As raízes e rizomas fazem parte da parte subterrânea da planta, enquanto o colmo, as folhas e as flores fazem parte da parte aérea. A Figura 2.1 mostra a estrutura da cana-de-açúcar.

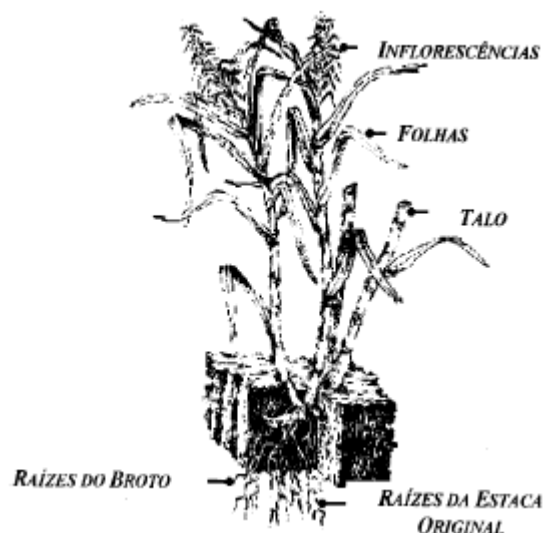


Figura 2.1: A cana-de-açúcar (TRIANA *et al.*, 1990).

Sua reprodução se faz assexuadamente, ou seja, através de colmos sementes que, pela brotação de suas gemas, dão origem aos colmos primários dos quais surgirão os secundários, depois os terciários, até a formação de uma touceira (SCHLITTLER, 2006). Pode atingir de 2 a 5 metros de altura, e apresentar diferentes tonalidades de cor. É composta principalmente por água e açúcares que se concentram nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante. Os colmos são caracterizados por nós bem marcados e entrenós distintos, quase sempre fistulosos e espessos, apresentam assim um alto teor de fibras. A composição química da cana é bastante

variável quanto à proporção dos elementos; porém, quantitativa e qualitativamente, exibe regularidades em todas as variedades. (SCHLITTLER, 2006).

Estruturalmente, a cana consiste de vários tipos de tecidos, tais como o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras muito lignificadas, sendo caracterizado pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras. Este tecido confere proteção contra os efeitos mecânicos externos, servindo de suporte para a planta. A parte interior do talo é constituída por um tecido parenquimatoso (medula) de caráter não fibroso, o qual possui como principal função o armazenamento do suco adocicado produzido pela planta. Imerso dentro deste tecido encontram-se as hastes fibrovasculares, compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos alimentos e outros produtos ao longo da planta (PATURAU, 1989). A Figura 2.2 apresenta um corte transversal da cana onde é possível observar a parte fibrosa e medular da planta.

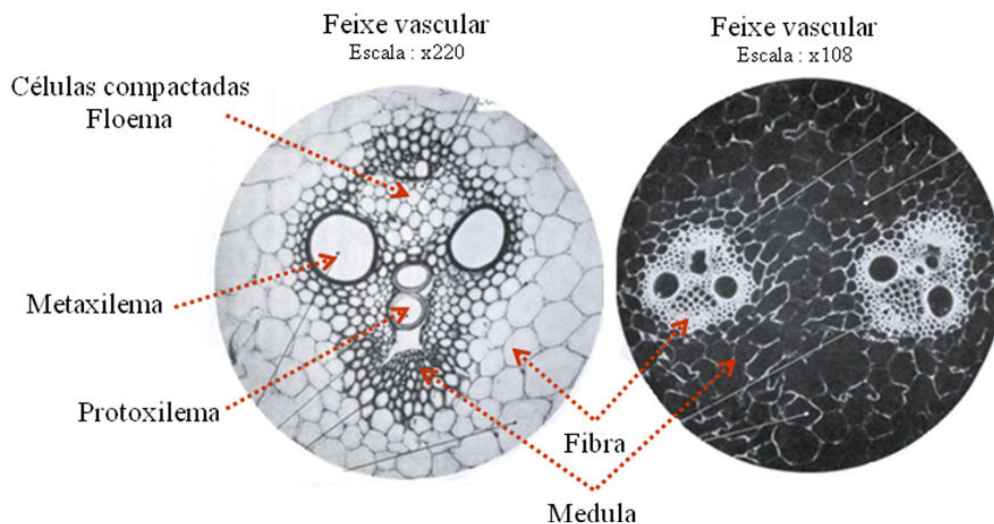


Figura 2.2: Micrografia da seção de cana (PATURAU, 1989).

De um modo geral, as células que constituem as frações de fibra e de medula são bastante diferentes fisicamente. As fibras possuem uma grande razão comprimento/diâmetro (cerca de 70) e um elevado coeficiente de expansão e contração sob processos de umedecimento

e secagem. Isto ocasiona forte integração entre as fibras e contribui para força e coesão necessárias para a produção de papel. As células da medula são de formas e tamanhos irregulares com a razão diâmetro/comprimento por volta de 5. A Tabela 2.1 apresenta a composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 2.1: Composição do bagaço de cana-de-açúcar – valores médios internacionais (PATURAU, 1989).

Tipo	Holocelulose*	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Total	70,5	36,0	26,0	20,0	2,2
Fibra	71,5	41,0	27,5	20,5	1,2
Medula	71,0	33,5	29,0	21,0	3,2

*Holocelulose indica a fração total de carboidratos do material da planta que fica depois da remoção da lignina.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar para a indústria de açúcar e álcool. Após a extração do caldo, do qual são produzidos o açúcar e o álcool etílico, o bagaço que sobra é em parte queimado para a geração de energia elétrica e térmica para os processos industriais (HASSUANI *et al.*, 2005). O uso de processos mais eficientes está levando o setor a tornar-se um gerador de excedentes de energia elétrica, possibilitando assim a hidrólise do material lignocelulósico restante para produção de açúcares fermentescíveis (rota química e biológica) ou a gaseificação deste material seguida pela síntese de combustíveis líquidos (rota térmica).

Devido ao excedente de bagaço e a legislação que restringe gradualmente a queima da palha no campo, o que deverá atuar positivamente para que este resíduo seja incorporado ao sistema de geração de energia nos próximos anos, foi estimado que as usinas de açúcar e álcool podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos (MACEDO, 2001). Com estes altos índices, espera-se que nos próximos anos sua utilização para energia, com a competição entre energia elétrica e a produção de etanol de 2ª geração, seja implementada em larga escala.

2.2. Biomassa Lignocelulósica

As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para produção de etanol, assim como para outros biocombustíveis. São compostas basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes. A Figura 2.3 apresenta um modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

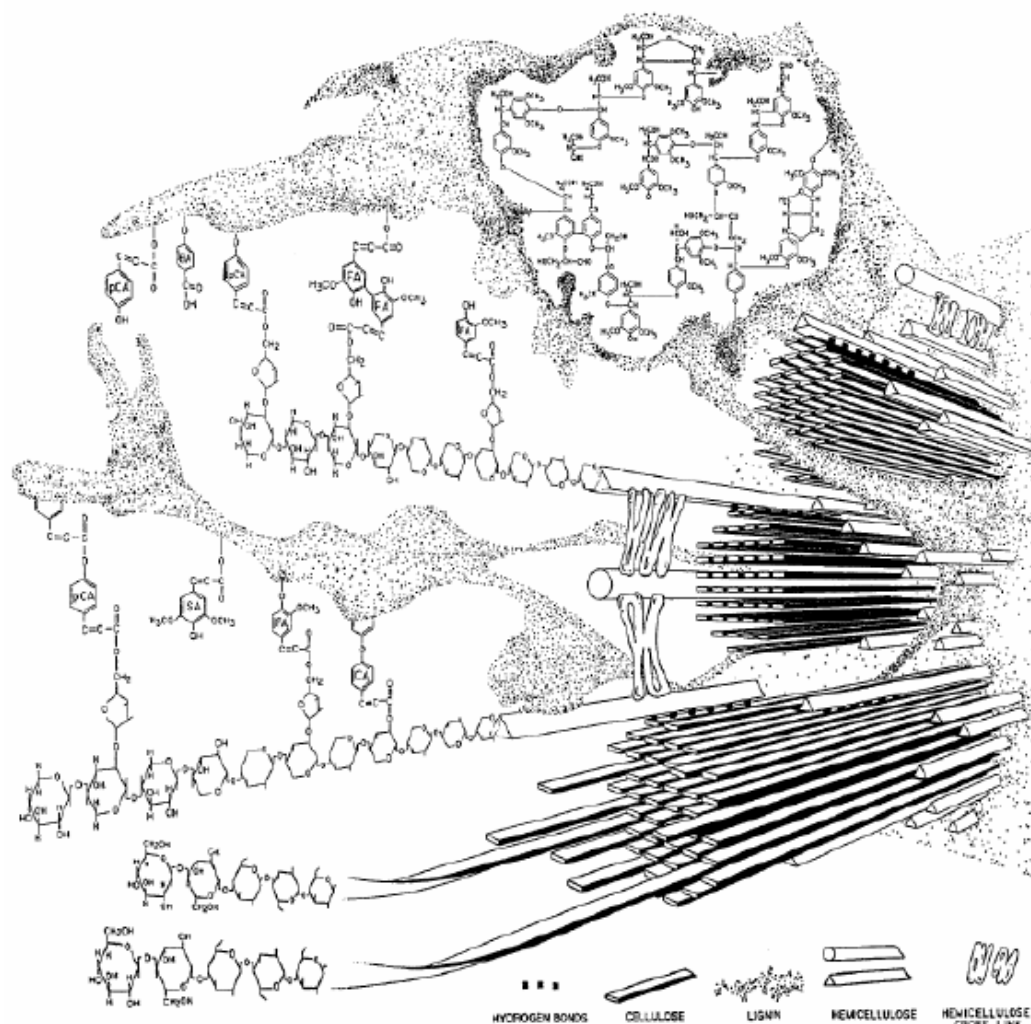


Figura 2.3: Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede secundária) (BIDLACK *et al.*, 1992).

Analisando a Figura 2.3 observa-se que os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto que a lignina circundante “gruda” os componentes e age como uma barreira física para o ataque de microrganismos e água. A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa.

Deste modo, os dois maiores obstáculos para impedir a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos são a recalcitrância da própria celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas, e a alta proteção que a lignina proporciona à estrutura celulósica, atuando como uma barreira física contra o ataque enzimático.

2.2.1. Celulose

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos. Quimicamente, é uma molécula simples formada por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Este polímero natural é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose (Figura 2.4).

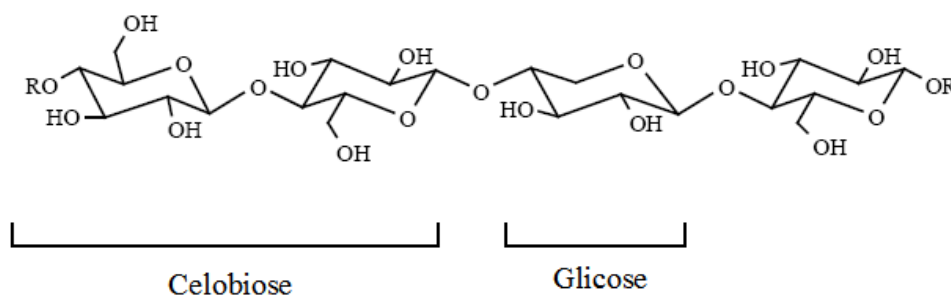


Figura 2.4: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (FENGEL e WEGENER, 1989).

Na celulose, as cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio na estrutura cristalina, sendo esta estrutura chamada de fibrila elementar, que consiste em aproximadamente 40 cadeias de glicana (BIDLACK *et al.*, 1992). A junção destas fibrilas elementares, que essencialmente apresentam comprimento infinito e uma largura de aproximadamente 250 Å, dá a formação das microfibrilas (FAN *et al.*, 1982).

As regiões dentro das microfibrilas que apresentam uma elevada ordem são denominadas de regiões cristalinas e as regiões menos organizadas, denominadas amorfas. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosos de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial em um dos tipos de estrutura (GAMA, 1996). Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação; já na região amorfa, a fibra apresenta maior grau de flexibilidade (FENGEL e WEGENER, 1989). A cristalinidade pode ser estudada por várias técnicas, como, por exemplo, raios-X, espectroscopia no infravermelho, Raman dentre outros (BRISTOW e KOLSETH, 1986).

O material amorfo é definido como o material que é disforme ou não apresenta uma forma definitiva, entretanto, a celulose amorfa provavelmente ainda possui algum grau de ordem (O'SULLIVAN, 1997). LARSSON *et al.* (1997) investigaram molecularmente a celulose e relataram que a maioria das regiões amorfas correspondia às cadeias situadas na superfície, visto que os componentes cristalinos ocupam o núcleo do microfibrila como apresentado na Figura 2.5 (A).

Uma arquitetura molecular diferente da celulose cristalina e amorfa é sugerida por MOSIER *et al.* (1999) e por TENKANEN *et al.* (2003). Ambos descrevem a celulose como sendo semicristalina, com regiões de elevada cristalinidade, com uma quantidade de aproximadamente 200 resíduos de glicose, separadas por regiões amorfas, como apresentado na Figura 2.5 (B).

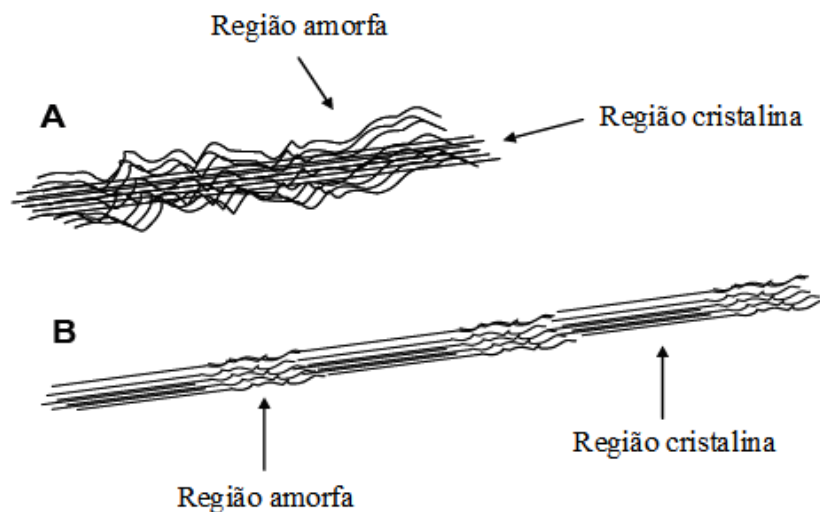


Figura 2.5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. **A:** Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. **B:** As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal.

As fibras de celulose, quando colocadas em contato com a água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento. A extensão do intumescimento da celulose pode ser intercristalino ou intracristalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões amorfas da microfibrila da celulose e nos espaços entre elas. O caso mais comum de intumescimento intercristalino é o inchamento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões cristalinas das microfibrilas. O intumescimento intracristalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (D.ALMEIDA, 1988).

A celulose existe em sete estruturas de cristal (estruturas polimorfas) designadas como celulose $I\alpha$, $I\beta$, II, III_I, III_{II}, IV_I, e IV_{II} (O'SULLIVAN, 1997). Na natureza, a celulose $I\alpha$ e $I\beta$ são as formas de cristal mais abundantes. $I\alpha$ é meta-estável, e assim, mais reativo do que $I\beta$. A porcentagem do polimorfo $I\alpha$ na celulose cristalina varia de 70% na celulose bacteriana (O'SULLIVAN, 1997), 64% na celulose isolada da alga *Valonia ventricosa*, e 20% no rami e na celulose do algodão (YAMAMOTO e HORII, 1994). A coexistência de dois polimorfos da

celulose nativa, dos quais tem estabilidades diferentes, pode implicar que a parte do polímero Ia dentro da microfibrila é mais propenso ao ataque enzimático.

Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras (Figura 2.6) que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.

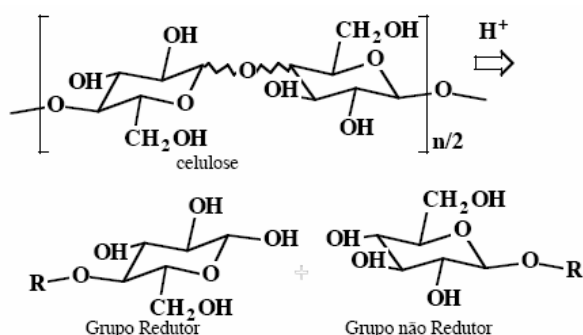


Figura 2.6: Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semicadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação β -D (1,4) glicosídica.

Apesar da sua simplicidade química, existe uma complexa gama de formas físicas da celulose devido principalmente à diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subseqüentes a que a biomassa celulósica é sujeita. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (BEGUIN e AUBERT, 1994).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Cerca de 30% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se a hemicelulose sendo este, portanto, um carboidrato abundante na

natureza (DA SILVA et al., 1997; HON e SHIRAISHI, 1991). As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 2.7).

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolíssacarídeo composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra. No caso de madeiras duras, tais como *Eucalipto* e bétula, nas quais a xilana corresponde de 20 a 35% do peso seco da biomassa, o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana, e em madeiras moles, como *Pinos*, vários cereais e gramíneas, é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana. Neste caso, a fração de xilana corresponde, em média, a 8% do peso seco da biomassa. Resíduos de ácido ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L-arabinose (HALTRICH et al., 1996; WONG et al., 1988).

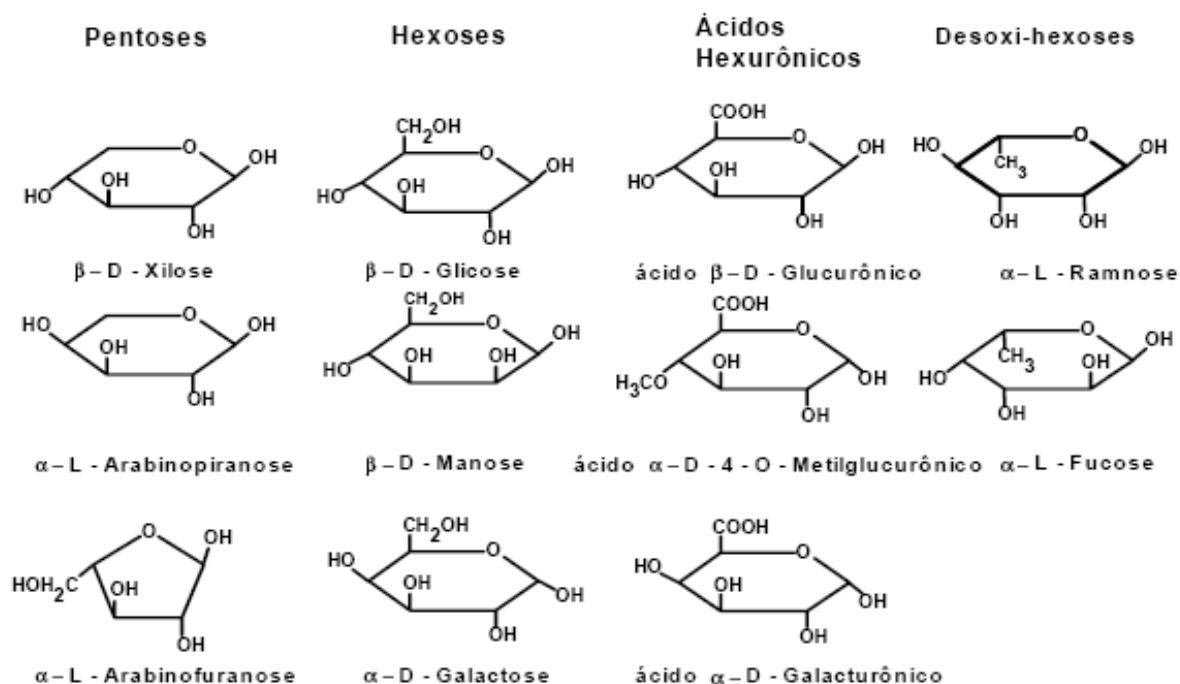


Figura 2.7: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

As hemiceluloses diferem da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas. A Tabela 2.2 apresenta algumas diferenças entre a celulose e hemicelulose.

Tabela 2.2: Diferenças entre celulose e hemicelulose (BIANCHI, 1995).

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose ligadas entre si	Unidades variadas de açúcares
Grau de polimerização elevado	Grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalinas	Foram somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose, devido, principalmente, a estrutura física. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa impossível. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (BIANCHI, 1995).

2.2.3. Lignina

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. Ela está presente principalmente na lamela média e na parede secundária. A lignina é a substância que confere rigidez à parede das células. Na madeira, age como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Além disso, está envolvida também com o transporte interno de água, nutrientes e metabólitos (BRISTOW e KOLSETH, 1986).

A lignina é incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. Apresenta um esqueleto básico de quatro ou mais unidades de fenilpropano por molécula substituída. Estes monômeros que formam a lignina são denominados álcoois cumarílicos, que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático:

- Álcool p-cumarílico, sem substituição, precursor das unidades p-hidroxifenílicas (H),
- Álcool coniferílico, com grupo metoxílico na posição 3 do anel aromático, precursor das unidades de guaiacil (G),
- Álcool sinapílico que dá lugar às unidades de siringilo (S) e apresenta os grupos metoxílico nas posições 3 e 5 do anel aromático.

A Figura 2.8 apresenta os precursores primários na formação da lignina.

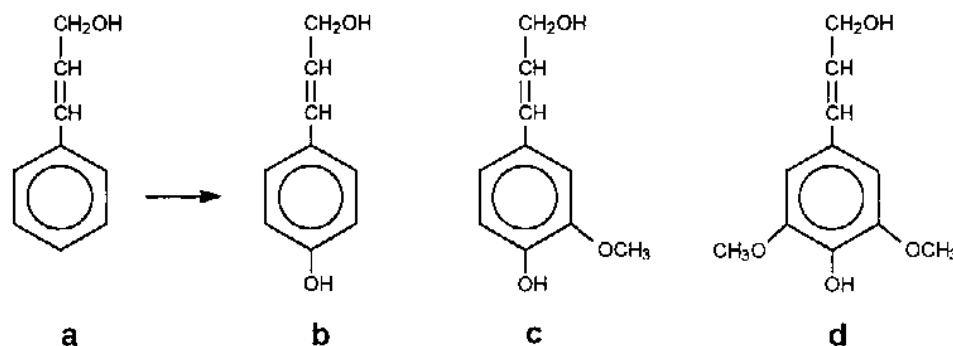


Figura 2.8: Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool trans-sinapílico (d), são os três precursores primários na formação da lignina no processo de polimerização desidrogenativa iniciada por enzimas (FENGEL e WEGENER, 1989).

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não conhecida completamente. A proporção dos precursores da lignina varia entre as diferentes espécies de plantas e a razão entre eles tem sido usada com propósitos taxonômicos. As ligninas de madeiras duras (Figura 2.9) apresentam em sua composição, além de grupos guaiacil, proporções mais

altas de grupos siringil, enquanto as ligninas de madeiras moles são mais ricas em grupos guaiacil. Como consequência desta diferença química, as ligninas de madeiras duras são menos condensadas e mais susceptíveis a conversão química e biológica que as de coníferas. As ligninas de gramíneas, tais como o bagaço de cana, apresentam grupos p-cumaril, além de grupos siringil e guaiacil (FAIX *et al.*, 1992; FENGEL e WEGENER, 1989; FERNANDEZ *et al.*, 1990).

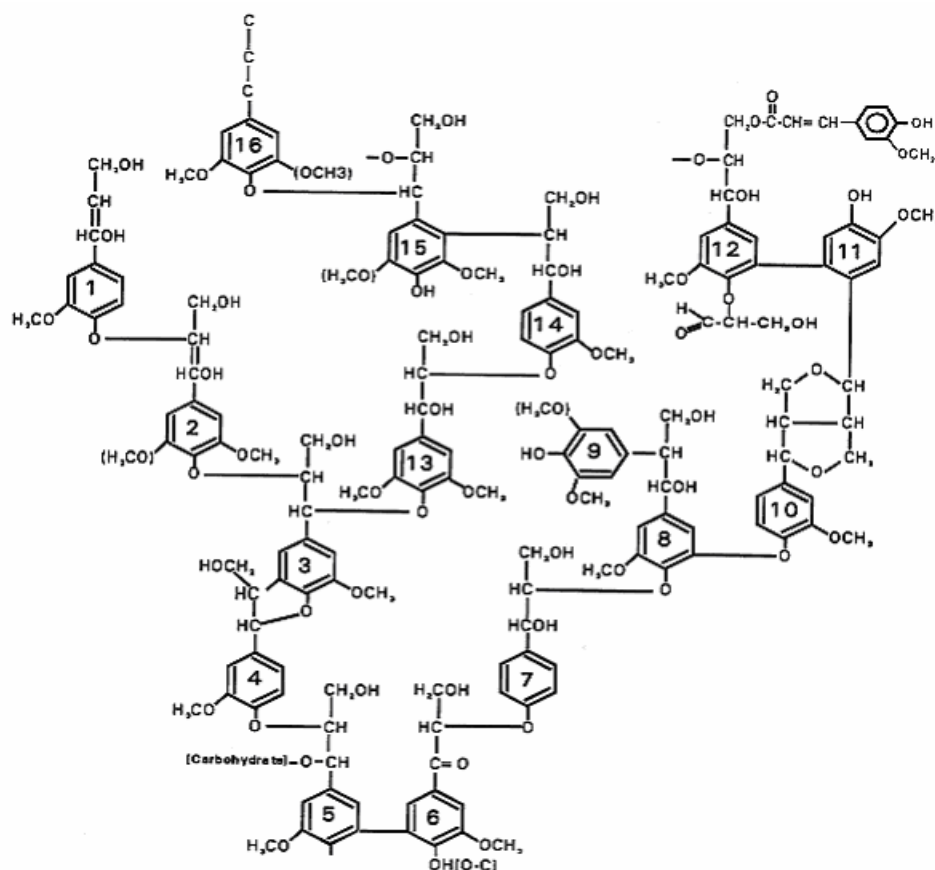


Figura 2.9: Estrutura da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (FENGEL e WEGENER, 1989).

A estrutura da lignina não é homogênea, apresentando regiões amorfas e estruturas globulares (BIDLACK *et al.*, 1992). A lignificação da parede celular é um processo controlado individualmente para cada célula, sendo a lignina o último polímero a ser depositado na parede celular, surgindo inicialmente nos cantos das células após a deposição da celulose na parede

secundária, que ocorre depois do término do processo de alongamento das células e quando começa o espessamento da parede secundária. A deposição da lignina prossegue pela lamela média, pela parede primária e continua na parede secundária, até a formação da parede terciária (FENGEL e WEGENER, 1989).

A interação entre a lignina, celulose e hemicelulose determinam a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos.

2.2.4. Pectinas

As pectinas são uma complexa família de polissacarídeos constituídos basicamente por ácido poligalacturônico e, em menor quantidade, ramnose, arabinose e galactose (BRETT e WALDRON, 1996b). A pectina é formada por um esqueleto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha(1,4)$. A cadeia de poligalacturônico esta interligada por resíduos de ramnose unidas por ligações $\alpha(1,2)$. Estes resíduos de ramnose podem ter unido a si largas cadeias laterais de L-arabinose e D-galactose. Em algumas pectinas, as cadeias laterais podem finalizar no ácido ferúlico unidos na posição O-3 da arabinose ou na O-2 da galactose (ANDERSEN, 2007).

As pectinas constituem o componente principal da lamela média da parede vegetal. São as frações mais facilmente extraíveis da parede celular, apresentando propriedades de gel. Além disso, o ácido galacturônico é uma molécula carregada negativamente, o que confere a parede celular a propriedade de trocadora de íons como o cálcio.

2.2.5. Outras Substâncias

Existem outras substâncias presentes na biomassa lignocelulósica que não são parte da parede celular e a maioria é solúvel em solventes neutros. Os compostos solúveis em solventes neutros ou frações extraíveis correspondem de 4-10% do peso seco da madeira. Incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas

ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis, que apresentam como representante principal os taninos. Dentro desta fração de extraíveis podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcalóides e lignina solúvel (KLINKE *et al.*, 2004).

Nas frações não extraíveis encontram-se parte das cinzas, resíduos inorgânicos, principalmente carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem depois de queimar o substrato a elevadas temperaturas, e representam aproximadamente 2% do peso seco das madeiras (KLASS, 1998). A proporção destes componentes estruturais nos resíduos agrícolas e em madeiras depende da espécie, idade, condições de crescimento, entre outros fatores.

2.3. Estrutura e Ultraestrutura da Parede Celular Vegetal

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em parede primária (P), parede secundária (S1, S2 e S3) e parede terciária (T). Essas camadas são compostas predominantemente por celulose com espessura da ordem de 5 μm e as células encontram-se separadas pela lamela média (L.M), que é uma camada fina (máximo 1 μm de espessura), composta por elevada concentração de lignina. A parede primária é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células (menor do que 0,1 μm de espessura) (FENGEL e WEGENER, 1989). A Figura 2.10 apresenta as camadas da parede celular e ilustra como a lignina envolve as células.

A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas (FENGEL e WEGENER, 1989).

A Figura 2.11 apresenta o esquema da associação dos três principais componentes na parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose existe na forma de microfibrilas, e os microcapilares que circundam a armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina. A Figura 2.11(A) mostra a vista transversal, isso ocorre quando a seção é perpendicular ao eixo longitudinal da fibra e a Figura 2.11(B) mostra a vista longitudinal em relação ao comprimento da fibra (FENGEL e WEGENER, 1989).

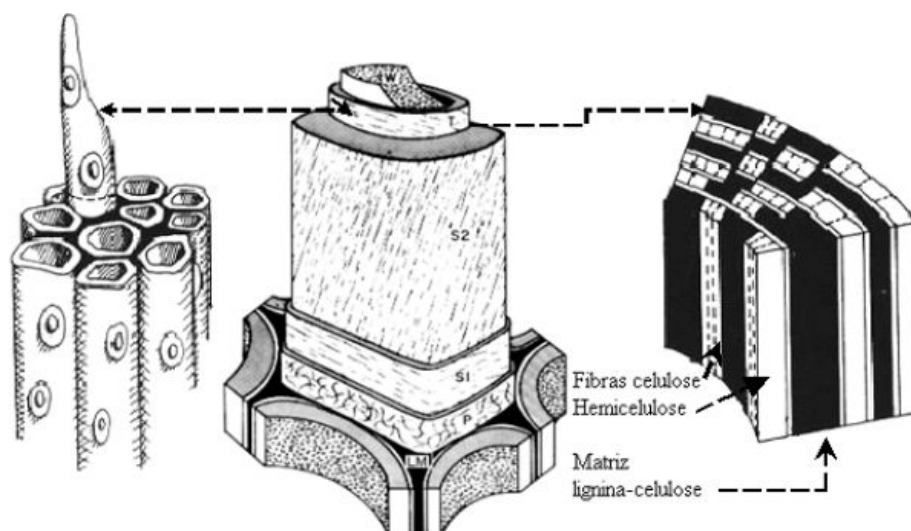


Figura 2.10: Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25 µm (KIRK e CULLEN, 1998).

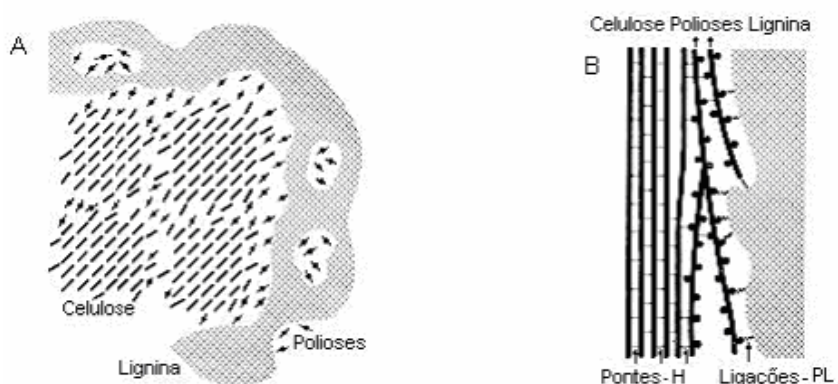


Figura 2.11: Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: **A** vista transversal e **B** vista longitudinal (FENGEL e WEGENER, 1989). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.

A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, dando assim forma a uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença da lignina em algumas paredes celulares dá uma força adicional, e fornece a

resistência às pestes e às doenças. A celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (HINMAN *et al.*, 1989; HO *et al.*, 1998; SREENATH e JEFFRIES, 2000; TAHERZADEH *et al.*, 1999). A presença da lignina na parede celular, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos carboidratos.

2.4. Processo para Produção de Etanol a Partir de Materiais Lignocelulósicos

O processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, baseado na hidrólise enzimática, consta basicamente de quatro etapas, com distintas possibilidades de combinação (SUN e CHENG, 2002): produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

2.4.1. Produção de Enzimas

As enzimas responsáveis pela degradação de materiais lignocelulósicos são produzidas principalmente por microrganismos como fungos filamentosos e bactérias. As espécies de fungos mais estudadas que produzem celulases são o *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Aspergilo niger*. Tais fungos excretam uma celulase de alta atividade no meio de cultura (CANEVASCINI e GATTEN, 1981; DUFF e MURRAY, 1996; FAN *et al.*, 1987; LARIOS *et al.*, 1984; LEE e FAN, 1980; PATHAK e GHOSE, 1973; STERNBERG, 1976). Entre as bactérias produtoras de celulase tem-se a *Cellulomonas fimi* e *Clostridium thermocellum* (BISARIA, 1991).

A fase de obtenção de enzimas a partir de microrganismos celulolíticos apresenta, em termos econômicos, por volta de 50% do custo global do processo de obtenção dos açúcares mediante hidrólise enzimática (WYMAN, 2001). Apesar da diminuição dos custos das enzimas nos últimos 20 anos, elas ainda representam um importante papel sobre o preço final do etanol.

Além dos altos custos dos preparados enzimáticos, estes apresentam uma baixa atividade específica, da ordem de 10-100 vezes menores que a atividade das amilases empregadas na

obtenção do etanol a partir de biomassa amilácea (HOWARD *et al.*, 2003), porque requerem grandes quantidades para obter bons rendimentos de açúcares.

Para melhorar estes aspectos, existem vários estudos sendo realizados: busca de mutantes hiperprodutores e novos microrganismos produtores mediante metagenômica (JACOBSEN *et al.*, 2005; KUZNETSOVA *et al.*, 2005), estudos de engenharia genética (DALBOGE, 1997) e otimização dos meios e das condições de produção. Em relação aos meios de produção, existem estudos propondo o emprego dos próprios materiais lignocelulósicos como matéria-prima na produção enzimática (JORGENSEN e OLSSON, 2006; JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Além do baixo custo da matéria prima, a fermentação em substratos sólidos oferece uma série de vantagens (TENGERTDY e SZAKACS, 2003), como o escasso requerimento tecnológico, não são necessárias condições estéreis durante o processo e, ao mesmo tempo, a mistura enzimática sintetizada é específica do substrato. As enzimas empregadas normalmente nos processos de hidrólise são obtidas de cultivos em estado sólido ou cultivos submergidos de *Trichoderma reesei* (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

Algumas destas tecnologias já se utilizam em escala industrial enquanto que outras são produzidas especificamente para os processos em que são utilizadas. Existem também alguns estudos sobre novas configurações do processo de obtenção de etanol que integre as etapas de produção enzimática, sacarificação e fermentação mediante o emprego de microrganismos celulolíticos e outros etanologênicos, ou mediante um único microrganismo com ambas propriedades.

2.4.2. Pré-tratamento

O processo de produção de etanol a partir do bagaço demanda a transformação da celulose em monômeros de glicose e subsequente conversão dos mesmos, por microrganismos, em etanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose torna-se muito recalcitrante à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão. Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento do

bagaço de modo a aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos.

O pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subseqüentes do processo. Basicamente, o pré-tratamento relaciona-se às operações de preparação de matéria-prima, bem como à hidrólise da celulose, geração de produtos inibidores à hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, concentrações sacarídicas dos hidrolisados produzidos, purificação de produtos intermediários, tratamento de resíduos, agitação mecânica e geração de energia (LEE *et al.*, 1994; LYND *et al.*; 1996; MOSIER *et al.*, 2003a, b). Neste contexto, deve-se buscar uma perfeita integração entre as diversas operações.

De modo geral, o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade (garantindo acessibilidade da celulose aos agentes hidrolíticos), simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e atributos ambientais, enquanto consiste em reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades (BAUDEL, 2006).

Os principais objetivos do pré-tratamento são: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quando na etapa de fermentação (HSU, 1996).

A Figura 2.12 apresenta um esquema da transformação da biomassa durante a etapa de pré-tratamento onde se observa a alteração da estrutura e aumento da área superficial da celulose (CHANG *et al.*, 1998).

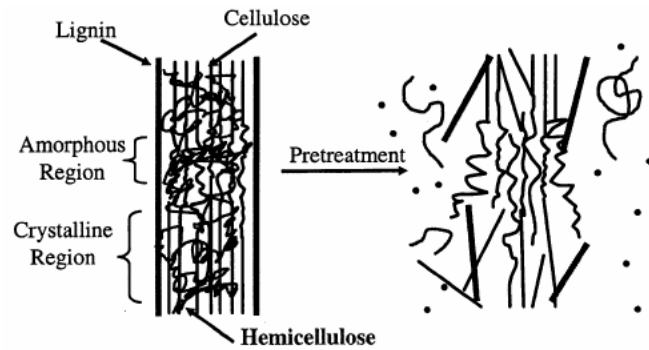


Figura 2.12: Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU *et al.*, 1980).

Os relacionamentos entre os fatores estruturais e composicionais refletem a complexidade dos materiais lignocelulósicos. A variabilidade nestas características explica a digestibilidade variando entre fontes diferentes de biomassa. Em princípio, um pré-tratamento eficaz causa o rompimento destas barreiras de modo que as enzimas hidrolíticas possam penetrar e causar a hidrólise (Figura 2.12) e minimiza também a degradação evitando a perda do açúcar (HOLTZAPPLE, 1993; LADISCH *et al.*, 1983; LYND *et al.*, 1991; MOSIER *et al.*, 1999).

A Figura 2.13 apresenta um esquema das etapas de pré-tratamento. A transformação entre celulose cristalina (C) e amorfa (C*) é reversível. Ambas formas rendem oligossacarídeos, que são hidrolisados a glicose. A degradação da glicose pode então originar inibidores da fermentação (WEIL, 1992).

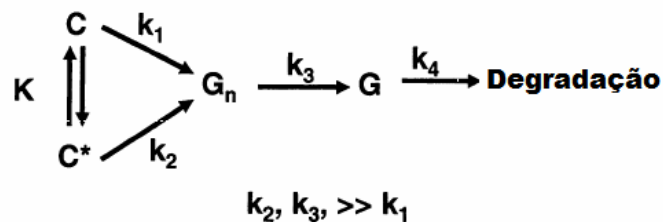


Figura 2.13: Esquema representativo dos passos do pré-tratamento.

2.4.2.1. Tipos de Pré-tratamento

Vários métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Em relação a sua natureza, estes podem se classificar em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (MOSIER *et al.*, 2005; SUN e CHENG, 2002). A Tabela 2.3 resume algumas técnicas de pré-tratamentos avaliadas para os materiais lignocelulósicos com o objetivo de facilitar a hidrólise enzimática. A evolução da eficiência dos pré-tratamentos tem sido baseada no rendimento de hidrólise após esta etapa, em função da qual se determina experimentalmente a condição ótima de operação em cada caso.

Embora muitos métodos de pré-tratamento tenham sido experimentados ao longo dos últimos anos, constata-se a crescente necessidade de desenvolver alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo global e competitividade econômica. Basicamente, extrações seletivas de componentes não-celulósicos (lignina e hemiceluloses) utilizando-se álcalis ou ácidos têm sido obtidas a custos relativamente razoáveis (BAUDEL, 2006).

Assim, parte dos objetivos deste trabalho são o estudo de dois pré-tratamentos químicos, hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, para o bagaço de cana em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de reagentes, visando à otimização desta etapa em termos de rendimentos de açúcares fermentescíveis.

Tabela 2.3: Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Métodos	Operações (fatores) que ocasionam mudança na estrutura do substrato	Tipo de mudança	Referências
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios γ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor).	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização.	AZUMA <i>et al.</i> (1985), KOULLAS <i>et al.</i> (1992), RAMOS <i>et al.</i> (1993b).
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes orgânicos.	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumento da porosidade.	FARID <i>et al.</i> (1983), SZCZODRAK <i>et al.</i> (1986), BES <i>et al.</i> (1989).
Biológico	Bolor branco (<i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc.).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	ROLZ <i>et al.</i> (1986), MES-HARTREE <i>et al.</i> (1987)
Combinado	Tratamento alcalino associado com explosão a vapor, moagem acompanhada com tratamento alcalino ou tratamento ácido.	Degradação da hemicelulose, deslignificação, aumento da área superficial e tamanho dos poros.	PURI e PEARCE (1989).

2.4.2.1.1. Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio (Cal)

Alguns produtos químicos têm sido estudados como agentes no pré-tratamento tais como: ácidos, bases, gases, solventes celulósicos, álcoois, agentes oxidantes e agentes redutores. Dentre estes produtos químicos, as bases são os agentes de pré-tratamento mais populares, porque são relativamente econômicos e degradam menos a celulose (CHANG *et al.*, 1998).

Algumas bases podem ser usadas para pré-tratar materiais lignocelulósicos e o efeito deste pré-tratamento alcalino depende do conteúdo de lignina neste material (FAN *et al.*, 1987; McMILLAN, 1994). O inchamento e diminuição da cristalinidade são os dois principais processos físicos que ocorrem durante a ativação da celulose pelo hidróxido de metal alcalino e alcalino terroso. Quando a celulose é intumescida, as forças intermoleculares são menores devido à solvatação, tornando as moléculas mais reativas. A razão disto é que as ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes de celulose são rompidas, no decorrer do fenômeno de intumescimento, devido à introdução de moléculas do agente intumescedor. Em tal estrutura intumescida, um reagente químico pode penetrar e propagar-se com mais facilidade (D.ALMEIDA, 1988).

Sendo assim, acredita-se que o mecanismo de pré-tratamento alcalino baseia-se na saponificação intermolecular das ligações cruzadas de ésteres da xilana presentes na hemicelulose com outros componentes, por exemplo, lignina e hemicelulose. A porosidade do material lignocelulósico aumenta com a remoção dessa ligação cruzada (TARKOW e FEIST, 1969).

Os processos de pré-tratamentos com bases utilizam temperaturas e pressões mais baixas se comparadas a outras tecnologias de pré-tratamentos. Os pré-tratamentos básicos podem ser realizados em circunstâncias ambientais, mas o tempo de pré-tratamento é medido em termos de horas ou dias. Ao contrário dos pré-tratamentos ácidos, uma limitação ocorre porque algumas bases são convertidas em sais irrecuperáveis ou incorporadas como sais na biomassa através das reações do pré-tratamento.

Hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e uréia são os álcalis mais comuns usados como agentes de pré-tratamentos. Embora o hidróxido de sódio aumente a digestibilidade da biomassa significativamente, este é de difícil reciclagem, além de ser uma base relativamente

cara. Por causa da volatilidade, a amônia pode ser reciclada facilmente, mas é considerada um agente de pré-tratamento caro, além da necessidade de uma maior atenção para manipulá-la. A uréia é de fácil manipulação, mas é considerada um produto de alto custo, além de causar um aumento não muito significativo na digestibilidade da biomassa quando comparado com o de outras bases. Por outro lado, o hidróxido de cálcio (cal) apresenta várias vantagens, já que é fácil de ser manipulado e apresenta um baixo custo. Uma outra vantagem é que a cal pode ser recuperada tratando-se a água de lavagem com gás carbônico, o que minimiza ainda mais o seu custo (CHANG *et al.*, 1998).

Sendo assim, devido aos baixos custos e segurança para manipulação, várias pesquisas têm utilizado a cal como um dos reagentes com grande potencial para o pré-tratamento da biomassa, apesar de apresentar menor solubilidade e ser mais fraca quando comparada com outras bases (CHANG *et al.*, 1998). O hidróxido de cálcio tem sido bastante usado como agente de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade enzimática de resíduos lignocelulósicos tais como o bagaço de cana, palha de trigo, palha de milho, dentre outros resíduos agroindustriais.

LESOING *et al.* (1981) trataram a palha de trigo com cal a temperatura ambiente durante 120 horas com a concentração de hidróxido de cálcio variando de 1 a 4%, 1,5 mL de água/g biomassa com partículas de biomassa de tamanho 2,54 cm. O melhor resultado foi obtido a uma concentração de 4% de hidróxido de cálcio, com um aumento da digestibilidade de 41% da biomassa não tratada para 76% da biomassa tratada.

VERMA (1983) também estudou os efeitos do pré-tratamento com cal para a palha de trigo. As reações foram realizadas a temperatura ambiente com concentrações de cal variando de 1 a 4% e tempos reacionais entre 24 e 120 horas. O melhor resultado foi conseguido a uma concentração de 4% de cal e tempo reacional de 72 horas, observando um aumento da digestibilidade da biomassa de 48% (não tratada) para 74% (tratada).

Segundo PLAYNE (1984), após um estudo com diferentes bases, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio mostrou-se mais eficiente que o pré-tratamento com hidróxido de sódio e amônia. Selecionando o pré-tratamento com cal para o bagaço de cana-de-açúcar, trabalhou-se com uma temperatura reacional de 20°C, durante 8 dias e com a quantidade de hidróxido de cálcio variando entre 0,12 e 0,3 g/g biomassa. A quantidade de água foi de 0,87 g/g biomassa e o

tamanho das partículas de 2,25 mm. A condição ótima de pré-tratamento mostrou que após 192 horas o efeito da digestibilidade proporcionou um aumento de 19% (biomassa não tratada) para 72% (biomassa tratada) ao se utilizar uma massa de 0,3 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ de biomassa.

NAGWANI (1992) realizou estudos com bagaço de cana e mostrou que o tempo e a temperatura impactam significativamente no pré-tratamento e representam assim parâmetros importantes a serem analisados. Inversamente, a massa de cal teve muito pouca influência no pré-tratamento, apresentando um valor ótimo de 0,1 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ biomassa seca, sendo que o volume de água não apresentou praticamente nenhum efeito.

CHANG *et al.* (1997) usaram hidróxido de cálcio para aumentar a digestibilidade de *switchgrass*. Após estudos das condições, o melhor pré-tratamento foi de 2 horas a temperatura de 100 e 120°C com uma quantidade de hidróxido de cálcio é 0,1 g/g de biomassa e 9 mL de água/g biomassa. Usando as condições de pré-tratamento recomendadas, a hidrólise foi efetuada em três dias com um rendimento de glicose e xilose de 5 e 21 vezes maior do que usando biomassa não tratada, respectivamente. Balanços de massa mostraram que uma pequena parte da celulose, aproximadamente 10%, foi solubilizada durante o pré-tratamento e que 26% da hemicelulose e 29% da lignina foram solubilizadas nessas condições.

CHANG *et al.* (1998) estudaram a digestibilidade do bagaço de cana e da palha de trigo utilizando hidróxido de cálcio como agente de pré-tratamento. O estudo sistemático das condições do pré-tratamento sugeriu que em um pré-tratamento com menor tempo (1-3 h), altas temperaturas (85-135°C) são requeridas para conseguir alto rendimento de açúcar, enquanto que para longos tempos de pré-tratamento (aproximadamente 24 h), baixas temperaturas (50-60°C) são efetivas. A quantidade de hidróxido de cálcio recomendada foi de 0,1 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ biomassa seca. A água apresenta pouco efeito na digestibilidade. Mediante as condições recomendadas, efetuou-se a hidrólise enzimática (5 FPU/g biomassa seca e 28,4 CBU/g biomassa seca) sendo que ao 3º dia o rendimento de glicose para o bagaço aumentou de 153 para 659 mg glicose/g biomassa, e para o pré-tratamento da palha de trigo aumentou de 65 para 650 mg glicose/g biomassa. O balanço de massa mostrou que o rendimento da biomassa após o pré-tratamento com cal foi de 93,6%.

KAAR e HOLTZAPPLE (2000) trataram resíduos da colheita do milho com hidróxido de cálcio aumentando a hidrólise enzimática em 9 vezes se comparada com a biomassa sem pré-tratamento. As condições recomendadas para o pré-tratamento foram: 0,075 g de $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ biomassa seca, 5 g de água/g biomassa seca, temperatura de 120°C por 4 horas. Este pré-tratamento conduziu a conversões de aproximadamente 100% e os autores concluem que o sucesso na etapa de hidrólise depende da concentração da enzima.

Ainda segundo os autores, o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido de cálcio é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes. Além disso, este pré-tratamento remove o acetil e as várias substituições dos ácidos urônicos na hemicelulose que diminuem a acessibilidade da enzima à superfície da hemicelulose e da celulose. A adição de ar/oxigênio à mistura reacional melhora extremamente a deslignificação da biomassa, especialmente para materiais altamente lignificados tais como a madeira.

CHANG *et al.* (2001) mostraram que o pré-tratamento oxidativo utilizando hidróxido de cálcio na polpa de madeira a 150°C por 6 h removeu 77,5% da lignina e aumentou o rendimento de glicose na hidrólise enzimática de 7% (não tratada) para 77% (tratada).

KIM e HOLTZAPPLE (2005) pré-trataram resíduos da colheita de milho com um excesso de hidróxido de cálcio (0,5 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ biomassa seca) em condições oxidativas e não oxidativas a 25, 35, 45 e 55°C. A condição ótima encontrada foi de 55°C por 4 semanas de reação efetuada com aeração. As glicanas (91,3%) e xilanas (51,8%) foram convertidas à glicose e xilose, respectivamente, quando o resíduo foi hidrolisado enzimaticamente com 15 FPU/g celulose. Somente 0,073 g de hidróxido de cálcio foram consumidos por grama da biomassa seca. Observou-se que 87,5% da lignina foi removida e houve uma remoção quase que total do grupo acetil. Além disso, o licor do pré-tratamento não apresentou efeito inibitório durante o processo de fermentação.

MOSIER *et al.* (2005) afirmaram que para materiais menos lignificados, tais como a palha de milho, a adição do oxigênio aumenta muito pouco a digestibilidade da biomassa durante o pré-tratamento utilizando uma relação de biomassa/cal de 1:0,075 a 120°C por até 6 h. O pré-tratamento da palha de milho foi otimizado para um tempo de 4 h a 120°C conseguindo

desprender 32% da lignina. A hidrólise rendeu 88% glicose após 7 dias de hidrólise, com uma carga enzimática de 25 FPU/g de biomassa.

Ainda segundo os autores, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresenta um alto efeito na acessibilidade da área superficial do substrato, além de alterar a estrutura e remover a lignina. Em contrapartida, ele apresenta um menor efeito na remoção da hemicelulose se comparado com outros pré-tratamentos (explosão a vapor, ácido diluído, água quente com pH controlado, etc.).

SAHA e COTTA (2008) estudaram o pré-tratamento da casca de arroz com hidróxido de cálcio. O rendimento máximo de açúcares foi de 154 ± 1 mg/g casca (rendimento de 32%), utilizando 100 mg Ca(OH)_2 /g biomassa seca a 121°C por 1 h e efetuando a sacarificação enzimática com mistura de enzimas comerciais (celulase, β -glicosidase e hemicelulase). O pré-tratamento com cal não gerou nenhum furfural e 5-hidroximetilfurfural detectável no hidrolisado. A concentração de álcool etílico produzido, utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinada a pH 6,5 e 35°C em 19 h, foi $9,8 \pm 0,5$ g/L, com um rendimento de 0,49 g/g açúcares livres. A concentração do álcool etílico foi de $11,0 \pm 1,0$ g/L no caso da sacarificação e fermentação simultânea utilizando a mesma linhagem de bactéria.

MAAS (2008) otimizou o pré-tratamento com cal para a palha de trigo, obtendo como melhores condições de trabalho 0,15 g/g de cal, temperatura de 85°C durante tempos de 20 h, atingindo rendimentos de 93% de glicanas e 81% de xilanas. O rendimento deste pré-tratamento quando comparado com o que emprega água quente é 3 a 4 vezes maior.

XUA *et al.* (2010) estudaram a hidrólise enzimática do *switchgrass* pré-tratado com hidróxido de cálcio em temperaturas amenas, 50 e 21°C , e posteriormente comparando os resultados com a temperatura de 121°C . Os efeitos do tempo de residência, da carga de cal e da lavagem da biomassa sobre a eficiência da produção de açúcar foram as variáveis investigadas. Sob as melhores condições do pré-tratamento (50°C , 24 h, 0,10 g Ca(OH)_2 /g biomassa bruta, submetido a uma lavagem de 100 mL de água/g biomassa bruta), os teores de glicose, xilose e açúcares redutores totais atingiram 239,6, 127,2 e 433,4 mg/g biomassa bruta, sendo, respectivamente, 3,15, 5,78 e 3,61 vezes maior do que a biomassa não tratada. O estudo sobre a ligação cálcio-lignina mostrou que os íons cálcio ligam-se na molécula de lignina em baixa

condição alcalina, o que diminuiu substancialmente a solubilização da lignina durante o pré-tratamento, mas o alto conteúdo de lignina na biomassa pré-tratada não comprometeu o aumento da hidrólise enzimática.

Embora vários autores exaltem a eficácia do pré-tratamento com a cal variando algumas variáveis do processo, poucos estudaram sistematicamente o efeito de diferentes combinações de todas as variáveis do processo, sendo este um dos alvos do nosso estudo. Além disso, estudos atuais comprovam a eficácia deste pré-tratamento.

2.4.2.1.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino

Na natureza, a lignina é degradada por vários microrganismos, principalmente para aumentar a acessibilidade da celulose para a digestibilidade enzimática. Apesar do mecanismo de degradação natural da lignina ser desconhecido, é conhecido que os agentes oxidantes, tal como o peróxido de hidrogênio, apresenta um importante papel neste processo (FORNEY *et al.*, 1982; KUTSUKI e GOLD, 1982).

Os pré-tratamentos oxidativos têm sido usados para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar a hidrólise enzimática e a biodegradação. O peróxido de hidrogênio é usado para reagir com a lignina sob certas condições, e tem sido largamente usado por vários anos como alvejante em polpas de madeira altamente lignificadas para a produção de papel (REICHERT e PETE, 1949).

O peróxido de hidrogênio alcalino é um agente efetivo na deslignificação e solubilização da hemicelulose. Isto é devido à formação do ânion hidroperóxido (HOO^-), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe em radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos (carboxil), quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina e hemicelulose (FANG *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2004).

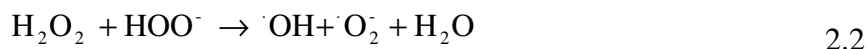
Para o entendimento do mecanismo da reação de deslignificação utilizando peróxido de

hidrogênio alcalino é necessário examinar completamente as reações envolvidas na sua decomposição (GOULD, 1985).

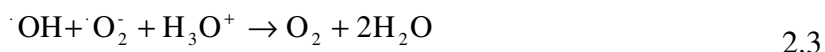
Em pH alcalino, a dissociação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) forma o ânion hidroperóxido (HOO^-):



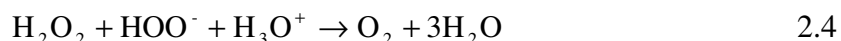
Com o pH a 11,5, o ânion hidroperóxido pode reagir com o H_2O_2 não dissociado para formar um radical hidroxila altamente reativo ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) como mostra a reação 2.2.



Na ausência de outros reagentes, radicais hidroxílicos e superóxidos reagem entre si formando oxigênio e água:



Então, a reação geral de decomposição do peróxido de hidrogênio pode ser resumida na reação 2.4.



Analisando a reação 2.4, fica claro que a quantidade máxima de O_2 que pode estar envolvida na solução alcalina de H_2O_2 é igual a metade da quantidade molar de H_2O_2 originalmente presente, ou seja, rendimento total de 0,5 mol de O_2 /mol de H_2O_2 . Se outros compostos que reagem com $\cdot\text{OH}$ e/ou $\cdot\text{O}_2^-$ estiverem presentes, haverá uma competição com a

reação 2.3, e poderá ser observada uma redução de O_2 no meio reacional.

Quando o peróxido de hidrogênio se decompõe em condições alcalinas na presença do substrato contendo lignina, uma menor quantidade de O_2 é envolvida se comparada com a quantidade teórica máxima, indicando que pelo menos alguns dos intermediários reativos formados na reação de decomposição do peróxido foram incorporados nos produtos oxidados da lignina. O fato que a extensão da deslignificação é máxima em pH 11,5 sugere fortemente que estes intermediários são gerados via reação (2.2), sendo a reação fortemente dependente do pH. A diminuição na eficiência da deslignificação e sacarificação das amostras tratadas a pH menor que 11,5 parece eliminar a possibilidade da oxidação direta significativa da lignina pelo HOO^- , porque a concentração de HOO^- na mistura reacional seria aumentada em pH maiores que 11,5.

Com isso, fica claro que a lignina é provavelmente o principal alvo do ataque químico na reação alcalina do peróxido de hidrogênio. As mudanças observadas nas propriedades físicas e morfológicas das fibras de celulose sugerem que pelo menos uma parcela das unidades de glicose pode também ser liberada durante o tratamento. Se isso for verdade, a porcentagem de glicose total liberada deve ser pequena (<5%) sendo que aproximadamente 95% ou mais da celulose presente no resíduo insolúvel após o tratamento alcalino com peróxido é liberada durante o processo de hidrólise com a celulase. A liberação de uma pequena porcentagem de unidades de glicose na celulose deve ser suficiente para romper as ligações de hidrogênio, proporcionando uma estrutura altamente aberta que não poderia se transformar em regiões cristalinas mesmo após a secagem a altas temperaturas, facilitando assim ainda mais o processo de hidrólise (GOULD, 1985).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, aumenta enormemente a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e conseqüentemente a produção de etanol (AZZAM, 1989). Várias condições do processo têm sido estudadas para otimizar a efetividade enzimática

Segundo GOULD e FREER (1984), palha de trigo, casca de semente e outros materiais lignocelulósicos podem ser utilizados para obtenção de açúcares redutores. Amostras de palha de trigo foram moídas, passadas por peneira de 2 mm de diâmetro e lavadas com água destilada por

4 horas para a remoção dos materiais solúveis. Após secagem, foram tratadas com água destilada contendo 1% de H_2O_2 . Hidróxido de sódio foi adicionado à suspensão pra manter o pH em 11,5. Foram utilizados 10 gramas de biomassa em 500 mL de solução a uma temperatura reacional de 25°C por 16 h. Ao final desse pré-tratamento, pouco mais da metade da lignina e a maior parte da hemicelulose foram solubilizadas, deixando o resíduo altamente suscetível à hidrólise enzimática da celulose. Os efeitos do peróxido de hidrogênio alcalino na solubilização da lignina, na diminuição do peso seco (principalmente devido à solubilização da hemicelulose) e no aumento da eficiência da sacarificação foram quase completados após 8 h de pré-tratamento a 25°C .

Ainda segundo os autores, aumentado a concentração de peróxido de hidrogênio para mais que 1%, com pH alcalino, não há grandes alterações na solubilidade da lignina. O que ocorre é um aumento na solubilidade da hemicelulose. Na ausência de H_2O_2 , ou seja, em um tratamento apenas com a base, somente uma pequena fração de lignina presente na palha de trigo foi liberada (3%) se comparada com o pré-tratamento oxidante alcalino (63%). A maior parte da hemicelulose foi solubilizada no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino se comparado com um pré-tratamento alcalino (72 e 23% de solubilidade, respectivamente). Já nos dois pré-tratamentos, a celulose permaneceu praticamente intacta (99%).

GOULD (1984) afirmou que aproximadamente metade da lignina e grande parte da hemicelulose presentes em resíduos agrícolas como palha de trigo e resíduos da colheita de milho foram solubilizados quando 1 g destes resíduos foram tratados com 50 mL de água destilada contendo solução alcalina de 1% (w/v) de peróxido de hidrogênio a uma temperatura de 25°C por 18 a 24 horas. A reação de deslignificação foi mais eficiente quando uma razão de peróxido de hidrogênio e substrato de 0,25 (w/w) foi utilizada a um pH de 11,5. A hidrólise da fração insolúvel com celulase de *Trichoderma reesei* apresentou um rendimento de glicose de quase 100%, baseada no conteúdo de celulose contida no resíduo após pré-tratamento.

Ainda segundo o autor, o início da deslignificação da palha de trigo pelo peróxido de hidrogênio depende do valor do pH da solução de pré-tratamento estar acima de 10,5 com a máxima deslignificação ocorrendo a pH 11,5 ou mais. O pré-tratamento da palha com peróxido de hidrogênio com pH menor que 10 apresentou baixa digestibilidade da biomassa sendo que 10-15% da lignina foi solubilizada a pH 6,8. Quando a palha foi tratada com peróxido a um pH de 10

ou mais, a hemicelulose contida na fração insolúvel diminuiu drasticamente. A eficiência da hidrólise enzimática na conversão da celulose à glicose também depende do pH durante o pré-tratamento. Amostras tratadas com pHs maiores que 10 mostraram uma maior eficiência na conversão, sendo o máximo de aproximadamente 100% de conversão no pH 11,5.

GOULD (1985) mostrou que a perda da integridade física da palha de trigo durante o pré-tratamento alcalino foi acompanhada por um aumento na absorção de água pela biomassa tratada. A biomassa sem tratamento absorveu água equivalente a 8 vezes o seu peso seco, já a biomassa tratada com peróxido de hidrogênio alcalino a 1% e pH 11,5 apresentou um aumento na absorção de água de 300%. O aumento da absorção após o pré-tratamento reflete a um aumento na hidratação da celulose, sugerindo uma significativa diminuição na proporção total da celulose que contém uma estrutura altamente cristalina. Esta condição é, além disso, suportada pela facilidade e rapidez com que a celulose tratada pode ser enzimaticamente hidrolisada.

Segundo AZZAM (1989), as condições mais importantes de estudo para o pré-tratamento incluem o tempo de contato, a concentração do peróxido de hidrogênio, e a temperatura do pré-tratamento. Resultados obtidos em seu trabalho mostraram que aproximadamente 50% da lignina e a maior parte da hemicelulose contida no bagaço de cana foram solubilizados utilizando uma concentração de 2% de peróxido de hidrogênio alcalino a 30°C em 8 horas. O conteúdo de celulose foi conseqüentemente aumentado de 42% do bagaço não tratado para 75% após o processo de oxidação. A sacarificação da polpa pré-tratada com celulase de *Trichoderma viride* a 45°C por 24 horas, apresentou um rendimento de glicose de 95%. A eficiência na produção de etanol da fração solúvel com *S. cerevisiae* obteve 90% de rendimento e aproximadamente 50% quando se utilizou o bagaço de cana sem tratamento.

AMJED *et al.* (1992) caracterizaram a alteração da parede celular e a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar, da medula do bagaço e da palha de trigo após tratamento de uma massa de substrato de 100 gramas com 25 gramas de peróxido de hidrogênio em 2,5 Litros de água destilada, adicionando hidróxido de sódio para atingir e manter o pH de 11,5. A reação foi agitada à temperatura ambiente (25°C) por 24 horas. Os resíduos insolúveis foram coletados, lavados com água até o efluente ficar neutro e posteriormente secos a 40°C por 7 dias. Após esse período, análises do material mostraram que a concentração de fibras totais e as fibras detergentes

neutras do resíduo aumentaram no líquido reacional, em relação ao substrato controle, durante o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, já que houve perdas maiores da matéria solúvel. A razão hemicelulose:celulose nas fibras é diminuída, o que leva a entender que houve a degradação da hemicelulose e a lignina de Klason apresentou um menor valor na fibra. Sendo assim, o peróxido de hidrogênio alcalino aumentou a digestibilidade dos resíduos lignocelulósicos, tendo removida grande parte da lignina e uma fração da hemicelulose.

KRISHNA *et al.* (1998) analisaram três métodos de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar: autoclavagem, tratamento alcalino e peróxido de hidrogênio alcalino. A hidrólise enzimática do bagaço tratado com o peróxido de hidrogênio alcalino mostrou-se superior ao tratamento com autoclave e ao tratamento com alcalóide. Selecionando o peróxido como melhor pré-tratamento, analisaram-se os parâmetros tais como tempo de reação, temperatura ótima para sacarificação, pH do meio e concentração de enzima para realização de uma sacarificação e fermentação simultâneas. O pré-tratamento da biomassa foi realizado com o bagaço de cana de tamanho 10 mesh e com uma solução de 1% de peróxido de hidrogênio alcalino. O melhor tempo para a reação de sacarificação foi 48 h com uma temperatura ótima de 50°C. O rendimento máximo de glicose foi de 70% obtido quando o bagaço pré-tratado teve o pH ajustado para 4,5 durante o processo de hidrólise e utilizando uma carga enzimática de 40 FPU/g biomassa.

SUN *et al.* (2000) realizaram um estudo comparativo da hemicelulose de palha de arroz utilizando um pré-tratamento alcalino seguido de um tratamento com peróxido de hidrogênio. Utilizando palha de arroz de tamanhos menores que 0,8 mm, primeiramente foi realizada uma extração para retirada de cera com uma solução de 1% de hidróxido de sódio a 55°C por 2 horas seguindo de um pré-tratamento com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% de peróxido de hidrogênio a 45°C por 12 horas a pH 11,5. Pôde-se observar que com o aumento da concentração de peróxido, houve um aumento considerável da solubilização da celulose, hemicelulose e lignina, de 2,5%, 67,2% e 68,3%, respectivamente, sem adição de peróxido, contra 17,8%, 88,5% e 95,1%, com adição de 5% de peróxido.

Ainda segundo os autores, a solubilização das cadeias de hemicelulose após tratamento alcalino, na ausência de peróxido de hidrogênio, favoreceu a solubilização das cadeias de menor tamanho, as quais são ricas em glicose, provavelmente originadas de cadeias de α -glicana,

enquanto que altas concentrações de peróxido aumentam a dissolução das cadeias de hemicelulose maiores, as quais são ricas em xilose, principalmente resultando da L-arabino-(4-O-metil-D-glucurônio)-D-xilana. O pré-tratamento com peróxido alcalino, nas condições estudadas, não afetou a estrutura macromolecular da hemicelulose, exceto pela visível degradação da celulose e hemicelulose durante o tratamento com mais de 1% de H_2O_2 .

Segundo YANG *et al.* (2002), a digestibilidade enzimática de cavacos de madeira tratados com explosão a vapor (195°C, 4,5 min e 4,5% (w/w) SO_2) é significativamente aumentada usando um tratamento com peróxido alcalino otimizado. O melhor rendimento de glicose foi conseguido quando o material pré-tratado com explosão a vapor foi tratado com 1% de H_2O_2 a pH 11,5 e 80°C por 45 min. Aproximadamente 90% da lignina foi solubilizada levando a um resíduo rico em celulose que foi completamente hidrolisado após 48 horas, usando uma carga enzimática de 10 FPU/g celulose. Aproximadamente 82% do polissacarídeo original pôde ser recuperado e os 18% não recuperáveis foram degradados durante a explosão a vapor.

De acordo com CARA *et al.* (2006), madeira de oliveira, com tamanhos de partículas menores que 10 mm, foram submetidas ao pré-tratamento de explosão a vapor a 190, 210, 230 e 240°C por 5 min. Para aumentar o rendimento de hidrólise, a fibra insolúvel, após a etapa de pré-tratamento, foi tratada com uma solução de peróxido de hidrogênio alcalino a 1% (w/v) a uma concentração de sólidos de 4% (w/v), utilizando uma solução de hidróxido de sódio para ajustar o pH até 11,5. O pré-tratamento foi realizado por 45 min a 80°C. Após hidrólise enzimática observou-se que o máximo rendimento foi obtido para os resíduos pré-tratados por explosão a vapor a 190°C, tendo o rendimento aumentado consideravelmente após o pré-tratamento com peróxido (de 6,8% para 61,9%) utilizando 10% de sólidos e uma carga enzimática de 15 FPU/g biomassa e 12,6 CBU/g biomassa de celulase e β -glicosidase, respectivamente.

Estudos realizados por YAMASHITA *et al.* (2010) mostraram a eficiência de diferentes pré-tratamentos para o bambu, visando uma maior eficácia após sacarificação enzimática. Os resultados para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino levaram a altas concentrações de glicose e de açúcares redutores (399 e 568 mg/g biomassa seca, respectivamente) após hidrólise da biomassa pré-tratada com 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio e adição de 1% (g/g) de hidróxido de sódio a 90°C por 60 min.

2.4.2.2. Formação de inibidores

Componentes inibitórios podem ser classificados em dois grupos: inibidores originalmente presentes na biomassa e inibidores produzidos por condições severas na etapa do pré-tratamento.

Os inibidores presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Em contrapartida, os pré-tratamentos que trabalham em condições drásticas, ou seja, presença de reagentes ácidos combinados com altas temperaturas são fortemente passíveis à formação de produtos inibitórios devido à degradação dos açúcares e da lignina, levando assim à produção de ácidos orgânicos. A Figura 2.14 mostra a procedência de cada um dos inibidores proveniente de diferentes constituintes da biomassa.

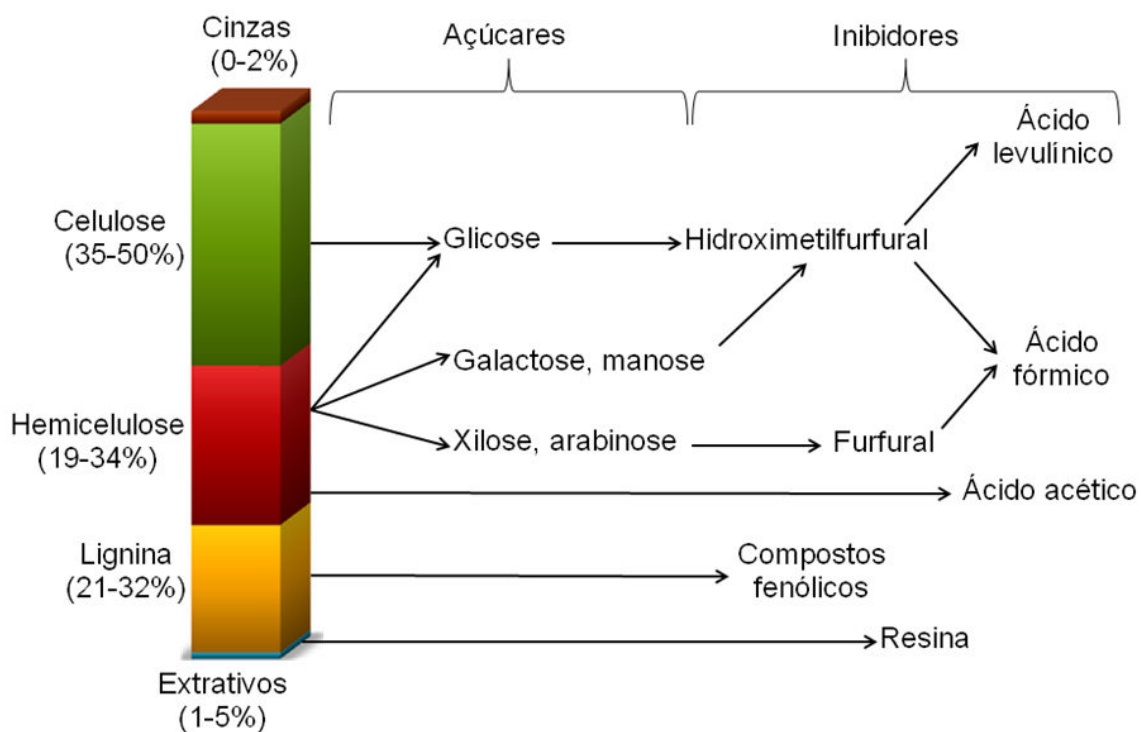


Figura 2.14: Formação dos componentes inibitórios (Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b).

Da degradação das pentoses resulta o furfural e da degradação das hexoses, o inibidor produzido é o 5-hidroximetilfurfural (HMF), os quais são bastante problemáticos para a etapa da fermentação (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). Quando é promovida a degradação destes inibidores, o ácido fórmico e levulínico são formados. Compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, catecol e siringaldeído podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b). Uma variedade de métodos biológicos, físicos e químicos pode ser aplicada com o fim de reduzir a concentração de inibidores antes de realizar a etapa de hidrólise enzimática e fermentação.

2.4.3. Hidrólise da Biomassa

Existem basicamente três técnicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas ($<100^{\circ}\text{C}$). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto final. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva à degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (SZENGYEL, 2000).

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada, levando a uma inibição durante o processo de fermentação (CLARK e MACKEL,

1984; LARSSON *et al.*, 1998; WYMAN, 1994).

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulasas. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para atingir uma alta conversão da celulose é necessário altas concentrações da enzima, o que aumenta o custo de produção (EKLUND *et al.*, 1990).

As condições de cada processo e os seus desempenhos aproximados são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise (HAMELINCK *et al.*, 2005).

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	<1% H ₂ SO ₄	215	3 min	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 h	90%
Enzimática	celulase	50	1,5 dias	75-95%

Em princípio, as rotas enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as rotas químicas, no contexto da produção de etanol a partir do bagaço de cana. As conversões enzimáticas aparecem como opções promissoras, em termos de custo global, em virtude da possibilidade de atingir rendimentos glicosídicos próximos ao teórico, além do fato de se poder contar com as técnicas modernas de microbiologia e engenharia genética, com vistas à otimização das etapas do processo integrado. Um grande desafio consiste em tornar o processo enzimático viável, de modo que a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas possa tornar-se competitiva com as demais rotas de produção de biocombustíveis em larga escala.

2.4.3.1. Hidrólise Enzimática

Uma vez pré-tratado nas condições adequadas, o material lignocelulósico é então hidrolisado à glicose mediante a ação de enzimas celulolíticas. As condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso.

Diversas características da biomassa são consideradas importantes para efetuar a hidrólise enzimática: quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra de celulose, e tamanho de partícula (SEWALT *et al.*, 1997). Mesmo com todas essas características sendo importantes, a eficácia de um pré-tratamento é relatada, frequentemente, em termos de rendimento glicosídico e não em termos da composição química e das características físicas da biomassa após o pré-tratamento.

Existem vários sistemas que podem ser utilizados para realização dos processos enzimáticos: sistemas contínuos ou descontínuos, que apresentam o inconveniente de causar inibição da enzima pelo produto final (glicose e celobiose) (PADUKONE, 1996); com enzimas imobilizadas, que não se apresenta como um sistema mais adequado já que não favorece a interação da enzima com o substrato uma vez que o resíduo após o pré-tratamento é insolúvel (MELANDER *et al.*, 2005); com enzimas recicladas, fermentação simultânea, bioreatores de membrana (BELAFI-BAKO *et al.*, 2006), dentre outros. As dificuldades de realizar estes processos industrialmente correspondem não só a características técnicas, mas também por fatores econômicos e ambientais.

2.4.3.1.1. As Enzimas Celulases

O sistema celulolítico é formado por distintos componentes que atuam sinergicamente e, ainda que as propriedades das enzimas pertencentes a diferentes espécies variem, estas apresentam um sistema de degradação de celulose similar.

Todas as celulasas de *T.reesei*, salvo a EG III, e a maioria das celulasas produzidas por outros microrganismos, compartilham da mesma estrutura: dois domínios bem diferenciados unidos por um peptídeo flexível (RABINOVICH *et al.*, 2002). Em um dos domínios reside a atividade catalítica (CD = Catalytic Domain) e no outro a capacidade da união dos carboidratos (CBM = Carbohydrate Binding Module), como mostra a Figura 2.15. Este CBM inicialmente foi denominado de domínio de união à celulose (CBD = Cellulose Binding Domain), já que os primeiros CBM descritos se uniam à celulose (TOMME *et al.*, 1995).

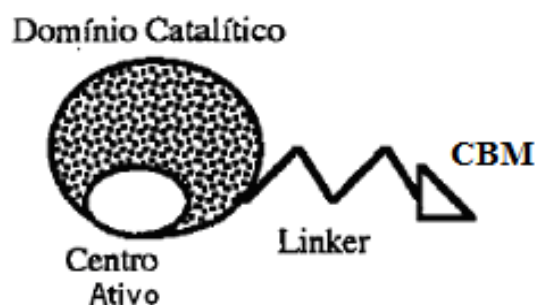


Figura 2.15: Representação esquemática de uma celulase (CAVACO-PAULO, 1995).

O CBM tem um papel importante na solubilização das zonas cristalinas da celulose nas cadeias individuais de glicana (LEMOS *et al.*, 2003), já que desestabiliza as ligações de hidrogênio (NIGMATULLIN *et al.*, 2004), envolvendo as cadeias mais acessíveis do domínio catalítico (QUENTIN *et al.*, 2003). Os CBM aumentam a concentração de enzimas na superfície do substrato sólido facilitando a ação das regiões ativas, ainda que possa também produzir uniões improdutivas no substrato a elevadas concentrações de enzima (PALONEN *et al.*, 2004).

Os principais componentes do sistema celololítico de *T. reesei* se resumem na Tabela 2.5. O fungo excreta majoritariamente exoglicanases, com 60% de CBHI e uns 20% de CBHII.

Tabela 2.5: Classificação e propriedades das celulase mais abundantes em *T.reesei* (OLSSON *et al.*, 2005).

Nomenclatura	Família	CBM ^a	Massa molecular ^b (Kda)
EG I	7	C	48,2
EG II	5	N	44,2
EG III	12	-	25,2
EG IV	61	N	35,5
EG V	45	C	24,4
CBH I	7	C	54,1
CBH II	6	N	49,7
BG I	3	-	78,4
BG II	1	-	52,2

a CBM, módulo de união ao carboidrato. Este pode estar situado no extremo aminoterminal (N) ou carboxiterminal (C) da proteína.

b Massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos.

Acredita-se que as diferenças existentes entre as estruturas dos domínios catalíticos da endoglicanases e celobiohidrolases são as responsáveis pela diferença no modo de ação delas. Nas celobiohidrolases (Figura 2.16A) o CD apresenta uma estrutura em túnel de aproximadamente 50 Å de comprimento, enquanto que nas endoglicanases (Figura 2.16B) o CD se dispõe de uma estrutura em fenda ou rachadura. (DIVNE *et al.*, 1994; HENRIKSSON *et al.*, 1996).

As enzimas que não apresentam CBM, ou seja, somente apresentam o domínio catalítico, tem mostrado que ainda apresentam habilidade para absorver a celulose, mas com mais baixa afinidade que as outras enzimas que apresentam os dois domínios (SCHULEIN, 1997; KARLSSON *et al.*, 2002).

As celulases podem ser classificadas por diferentes maneiras, mas os dois modelos de classificação predominantemente usados são aqueles baseados na especificidade do substrato e aqueles baseados na similaridade estrutural da enzima.

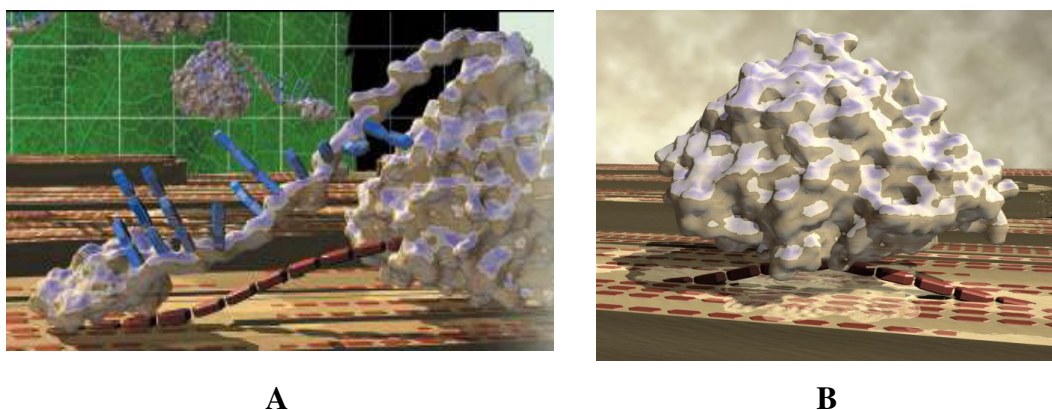


Figura 2.16: Estrutura tridimensional das enzimas celulolíticas. A imagem **A** mostra a celobiohidrolase, com o CBM, o peptídeo de união e o domínio catalítico com a forma de túnel. Na imagem **B** está representada a endoglicanase com o domínio catalítico com estrutura em fenda (NREL Research Review, 2003).

Geralmente, todas as enzimas celulolíticas pertencem as *O*-Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-), um grupo difundido de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e um não carboidrato. Tradicionalmente, as celulases foram classificadas em duas classes distintas: celobiohidrolases (CBH), também chamada de *exo*-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91), e *endo*-1,4- β -D-glicanases (EG) (EC 3.2.1.4), baseado em suas especificidades em relação ao substrato, ou seja, afinidade para as extremidades da cadeia ou para o interior da cadeia de glicose, respectivamente. A terceira classe de enzimas que trabalham em conjunto e de forma sinérgica com CBH e EG, são as β -glicosidases (BG) (EC 3.2.1.21). Estas enzimas não são referidas, frequentemente, como celulases “reais” já que elas hidrolisam as ligações glicosídicas de oligossacarídeos solúveis ou celobiose, não atuando assim na celulose propriamente dita.

A degradação bem sucedida da celulose exige a ação sinérgica do complexo celulolítico, tal qual para o gênero *Trichoderma*, formado por diversas enzimas *endo*- e *exog*licanases (HENRISSAT *et al.*, 1998), e duas β -glicosidases (BHIKHABHAI *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1992). A combinação da enzima produzida varia entre espécies e depende do microrganismo que a produziu.

• Endoglicanase (EGs)

As enzimas endoglicanases realizam quebras aleatórias nas regiões amorfas internas da cadeia de celulose, ou seja, regiões desordenadas hidratadas e flexíveis, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos (BOISSET *et al.*, 2000). São assim, antes de qualquer coisa, responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas. Consequentemente, as novas extremidades da cadeia de celulose são suscetíveis à ação da celobiohidrolase (LYND *et al.*, 2002).

A estrutura das diversas EGs foi estudada e revelaram a presença de curtos laços que criam um canal que provavelmente permite a entrada da cadeia de celulose para a quebra. A estrutura do núcleo catalítico do *Humicola insolens* foi determinado por análise de raio X, que indicou que a enzima apresenta uma forma esférica achatada com dimensões brutas de 42x42x22 Å (DAVIES *et al.*, 1993; DAVIES *et al.*, 1996; SANDGREN *et al.*, 2000), como apresentado na Figura 2.17.



Figura 2.17: Estrutura da endoglicanase de *H. insolens* (KRAULIS, 1991).

A hidrólise de padrões de EGs tem sido estudada utilizando vários tipos de substrato, incluindo a celulose microcristalina (Avicel), celulose amorfa (Celulose inchada com ácido fosfórico - PASC) e carboidratos solúveis (Carboximetilcelulose - CMC). Em geral, os resultados mostram a produção primeiramente da celobiose durante a hidrólise com EG I, EG II e EG III, e celotetraose durante a hidrólise com EGV (KARLSSON *et al.*, 2002).

• Celobiohidrolases (CBs)

A ação das exoglicanases (ou CBHs) ocorre nas extremidades das cadeias de celulose, liberando a celobiose como produto principal (ROUVINEN *et al.*, 1990; DAVIES e HENRISSAT, 1995; HENRISSAT, 1998). Ocasionalmente, glicose e celotriose são produzidas em pequenas quantidades durante o estágio inicial da hidrólise (DIVNE *et al.*, 1994). Uma característica importante de todas as celobiohidrolases é que elas podem atuar na celulose microcristalina (TERRI, 1997). Estudos de raio X mostraram os pequenos detalhes da estrutura tridimensional da CBH I, como apresentado na Figura 2.18.

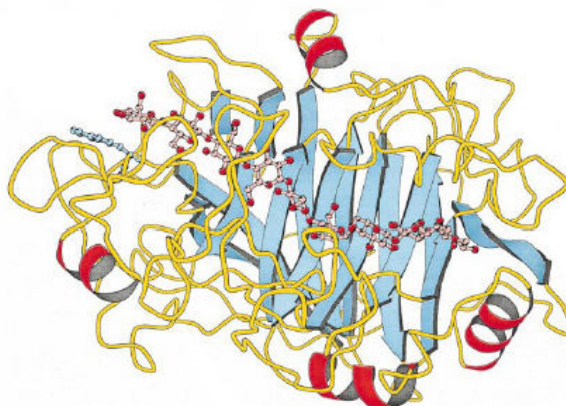


Figura 2.18: Representação esquemática do domínio catalítico CBH I de *T. reesei* (DIVNE *et al.*, 1998.).

Ao contrário do canal aberto presente nas EGs, o sítio ativo das CBHs situa-se dentro do túnel. Na CBH I de *T. reesei* este túnel apresenta 50 Å de comprimento (DIVNE *et al.*, 1994) enquanto que na CBH II o túnel é muito menor, apresentando 20 Å de comprimento (ROUVINEN *et al.*, 1990).

Celobiohidrolase semelhantes a CBH II tem apresentado túneis de sítios ativos menores, podendo apresentar graus crescentes de atividade da endoglicanase. Em outras palavras, a estrutura da CBH II de *T. reesei* tem mostrado que uma das fendas apresenta uma mobilidade substancial e que o túnel resultante pode estar fechado firmemente ou quase inteiramente aberto,

se assemelhando, assim, ao sítio ativo das EGs (ZOU *et al.*, 1999).

Estudos bioquímicos sugerem que CBH I hidrolisam as extremidades redutoras das cadeias de celulose em direção as extremidades não redutoras (BARR *et al.*, 1996; BOISSET *et al.*, 2000), enquanto que a hidrólise das extremidades não redutoras acontece em direção à extremidade redutora pela CBH II (MOSIER *et al.*, 1999).

EGs e CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto (celobiose e glicose). A celobiose apresenta um efeito inibidor nas enzimas maior que a glicose (HOLTZAPPLE *et al.*, 1990). Os modelos padrões de inibição, ou seja, inibição competitiva, não-competitiva, ou uma mistura destas, tem se mostrado dependente do tipo de ligação com a celulase, da concentração de enzimas, da área de superfície da celulose acessível às enzimas, da razão enzima/substrato, da natureza e concentração do substrato e da variação da atividade de β -glicosidase (GUSAKOV e SINITSYN, 1992; GRUNO *et al.*, 2004).

• β -glicosidases (BGs)

As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e celooligossacarídeos solúveis à glicose. A remoção do celobiose é uma etapa importante do processo de hidrólise enzimática, já que ajuda a reduzir o efeito inibitório da celobiose nas enzimas EGs e CBHs sendo a atividade da BG frequentemente a taxa limitante da reação de hidrólise (DUFF e MURRAY, 1996; TOLAN e FOODY, 1999). O mercado atual oferece muitos complexos de celulase que contêm níveis baixos de β -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose. Já que a celobiose apresenta um poder inibidor mais forte do que a glicose, e sua hidrólise ocorre através da ação das enzimas β -glicosidases, é indicado que se adicione no meio reacional uma certa quantidade desta enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Desta forma há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SUN e CHENG, 2002; SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Duas BGs foram isoladas do sobrenadante da cultura de *T. reesei* (CHEN *et al.*, 1992), entretanto, os estudos em diversas espécies de *Trichoderma* mostraram que uma grande fração

destas enzimas permanece ligada à parede celular da célula (MESSNER *et al.*, 1990; USAMI *et al.*, 1990). BGs de *T. reesei* estão sujeitas à inibição pelo produto final (glicose) (CHEN *et al.*, 1992), enquanto que aquelas produzidas por *Aspergillus* são mais tolerantes a glicose (WATANABE, 1992; GUNATA e VALLIER, 1999; DECKER *et al.*, 2000). Um exemplo dessa inibição foi descrita por CHEN *et al.* (1992), onde a BG I de *T. reesei* apresentando um $K_m=182 \mu\text{M}$ usando como substrato o *p*-nitrofenil- β -glicosídeo, teve, com o passar do tempo, sua constante de inibição K_i aumentada para $624 \mu\text{M}$ quando 5 mM de glicose foram liberadas no caldo hidrolisado.

2.4.3.1.2. Principais Fatores que Afetam a Hidrólise Enzimática

A área superficial e a cristalinidade são identificadas como os fatores estruturais mais importantes na susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática, já que estão diretamente relacionados à taxa inicial da hidrólise (RAMOS *et al.*, 1993a; WALKER e WILSON, 1991). Outras características importantes são o arranjo molecular da celulose e a presença de materiais estranhos tais como a lignina. Alguns fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e suas conseqüências no processo de modelagem são resumidos na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo (ANDERSEN, 2007).

	1	2	3	4	5
Fatores relacionado ao substrato					
Cristalinidade da celulose	x			x	
Grau de polimerização (DP)		x			
Disponibilidade/acessibilidade da área superficial	x	x	x	x	x
Organização estrutural (macro ou microestrutura)			x	x	
Tamanho de partícula			x	x	
Porosidade			x	x	x
Presença de lignina e hemicelulose	x			x	x
Fatores relacionados à enzima					
Natureza do sistema enzimático empregado (EG, CBH, BG)	x	x	x	x	x
Tamanho relativo das enzimas				x	
Concentração da enzima	x	x	x	x	
Adsorção	x	x	x	x	x
Sinergismo	x	x		x	
Inibição do produto final				x	x
Desativação mecânica					x
Inativação térmica					x
Irreversibilidade da ligação com a lignina				x	x

1: Aumento aparente da cristalinidade do substrato durante toda a hidrólise;

2: Diminuição do DP;

3: Mudanças contínuas na acessibilidade de superfície, e topologia da superfície (corrosão de superfície);

4: Mudanças contínuas na digestibilidade do substrato;

5: Diminuição da concentração de enzima ativa;

EG: Endoglicanase; CBH: Celobiohidrolase; BG: β -glicosidase

• Efeito da Cristalinidade

A cristalinidade é fortemente influenciada pela composição da biomassa. Em uma biomassa lignocelulósica, o índice de cristalinidade mede a quantidade relativa da celulose cristalina no sólido total. Apesar de muitos estudos indicarem que o índice de cristalinidade está

inversamente relacionado com a digestibilidade, TANAHASHI *et al.* (1983) observaram um aumento neste índice quando pré-trataram por explosão a vapor amostras de madeira. CHANG e HOLTZAPPLE (2000) também observaram um aumento no CrI após o pré-tratamento da palha do milho com hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o índice de cristalinidade aumenta principalmente devido à remoção de substâncias amorfas (lignina e hemicelulose) e não necessariamente devido a alterações na estrutura cristalina da celulose.

CARRARD *et al.* (2000) relatam que a cristalinidade da celulose pode ter influência na hidrólise quando há ausência de sinergismo devido a um sistema incompleto de celulases ou a uma insuficiente carga enzimática.

• Tamanho de Partícula

Estudos sobre hidrólise de polpa branqueada pelo processo Kraft mostraram que maiores tamanhos de partículas podem ser um fator inibitório, uma vez que a taxa de hidrólise foi mais lenta quando o material não foi submetido ao processo de redução da partícula (MOONEY *et al.*, 1999). Para a polpa moída, os autores observaram um aumento na taxa de hidrólise devido a uma maior quantidade de área superficial disponível para adsorção das enzimas.

CHANG *et al.*, (1997) mostraram que a diminuição do tamanho de partícula abaixo de 40 mesh não aumenta a taxa de hidrólise.

• Acetilação

O grau de acetilação da hemicelulose é um fator que tem recebido uma menor importância nos estudos. Entretanto, alguns trabalhos mostram que à medida que se desacetila as xilanas das hemiceluloses nas madeiras duras e herbáceas, a fração de celulose e hemicelulose se torna três vezes mais hidrolisável (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

• Lignina e Hemicelulose

A lignina e a hemicelulose desempenham um importante papel na taxa e no rendimento da hidrólise enzimática. Todos os resultados reportados na literatura mostram que a digestibilidade da celulose aumenta com a remoção destes constituintes (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000; DRAUDE *et al.*, 2001; THOMPSON e CHEN, 1992).

O principal papel inibitório da lignina foi atribuído à adsorção inespecífica da enzima em sua superfície (OOSHIMA *et al.*, 1990; SEWALT *et al.*, 1997) e à inacessibilidade à celulose, devido ao impedimento estérico (MOONEY *et al.*, 1998).

Estudos comprovam que a lignina e seus derivados são tóxicos aos microrganismos e às enzimas. Substratos com baixa concentração de lignina apresentam maior atividade enzimática requerendo uma menor carga de enzima no processo (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

Uma deslignificação completa da biomassa é bastante difícil devido ao fato da lignina se localizar profundamente na parede celular, ser hidrofóbica, de dura consistência e apresentar fortes anéis de ligação C-O-C, C-C, além de uma tendência à recondensação (complexo lignina-carboidrato) durante a deslignificação.

Segundo MUSSATTO *et al.* (2008), os efeitos da hemicelulose e lignina na hidrólise enzimática da celulose são principalmente físicos. RAMOS *et al.* (1993b) afirmaram que o aumento da acessibilidade das enzimas ao substrato pré-tratado pode ser atribuído à solubilização das frações de hemicelulose e lignina, levando como efeito benéfico a alteração da morfologia e estrutura do resíduo celulósico.

• Sinergismo

A ação sinérgica das diferentes classes de enzima envolvidas na degradação da celulose é essencial para a eficiência do processo de hidrólise. A sinergia entre as enzimas celulolíticas ocorre quando a ação combinada de duas ou mais enzimas conduz a uma taxa de reação mais elevada do que a soma de suas ações individuais (MANSFIELD *et al.*, 1999). Os dois tipos mais frequentemente relatados de sinergia envolvem a ação de endoglicanases e celobiohidrolases,

sendo chamadas de sinergia *endo-exo* (NIDETZKY *et al.*, 1994), ou de duas celobiohidrolases complementares, ou seja, atuando nas cadeias terminais redutoras e não redutoras da celulose, sendo denominado sinergismo *exo-exo* (HENRISSAT *et al.*, 1985; MEDVE *et al.*, 1994).

Em geral, o mecanismo aceito para explicar a ação das celulases é a ação sinérgica sequencial das endo e exoglicanases sobre a celulose (MEDVE *et al.*, 1998). A Figura 2.19 apresenta um esquema do mecanismo de ação do sistema celulolítico.

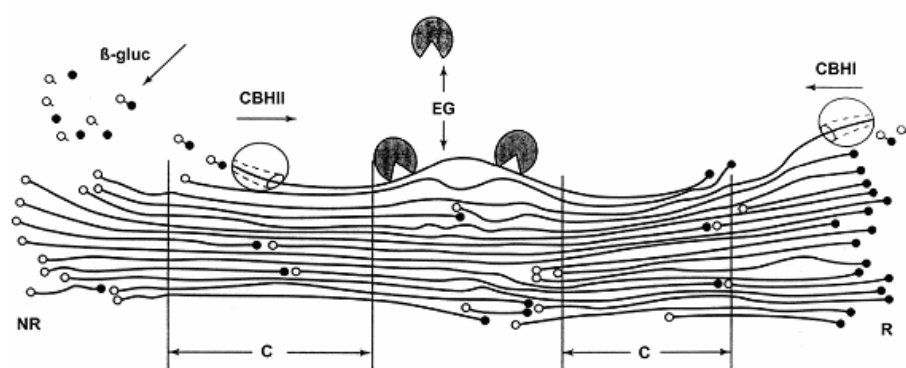


Figura 2.19: Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e BG de *Trichoderma reesei*. C define a região altamente ordenada (região cristalina), R os grupos terminais redutores (círculos preenchidos), e NR os grupos terminais não redutores (círculos não-preenchidos). Modificado de TEERI (1997).

Numerosos estudos realizados sobre sinergia entre as enzimas celulolíticas purificadas mostraram que a sinergia é dependente da proporção individual das enzimas (HENRISSAT *et al.*, 1985), da concentração (WOODWARD *et al.*, 1988), e das propriedades físico-químicas do substrato (HENRISSAT *et al.*, 1985).

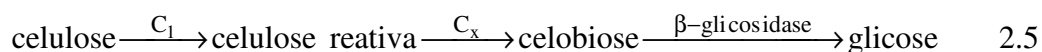
NIDETZKY *et al.* (1994) afirmaram que o grau ótimo de sinergismo aparece em concentrações não saturadas da enzima. CONVERSE e OPTEKAR (1993) relataram que há um baixo grau de sinergia quando se utiliza baixa concentração de enzima. Isso leva a uma baixa conversão, já que o número de extremidades das cadeias inicialmente presentes é suficiente para

que a reação se complete. A sinergia da celulase é igualmente baixa em concentrações elevadas de celulase devido à saturação da adsorção com celobiohidrolase, o qual é o componente preferencialmente adsorvido pelo substrato.

• Mecanismos de Catálise da Celulase

A hidrólise heterogênea da celulose é caracterizada por um reagente insolúvel (celulose) e por um catalisador solúvel (enzimas). As características estruturais da celulose e o modo de ação da enzima influenciam a taxa de reação. É um processo lento, já que a celulose de origem biológica tem uma estrutura altamente cristalina e o número de sítios ativos disponível na enzima é limitado.

A suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática é determinada pela acessibilidade das enzimas às ligações da cadeia, o que determina a adsorção subsequente da enzima no substrato (MEDVE *et al.*, 1997; NIDETZKY *et al.*, 1994). Diversos mecanismos foram propostos para a conversão real da celulose em glicose. O conceito inicial foi proposto por REESE *et al.* (1950), e é conhecido como o conceito C_1 - C_x . Os autores relataram que o componente C_1 ativava as cadeias de celulose e as enzimas C_x realizam a despolimerização, como mostra a reação:



Houve muita oposição à validade desta hipótese. LI *et al.* (1965) concordaram com a idéia de que o componente C_1 tem uma função não hidrolítica, entretanto, WOOD (1975) postulou que C_1 é um tipo especial da enzima hidrolítica incapaz de atacar a celulose cristalina em uma extensão significativa. Não obstante, esta enzima possui a capacidade de degradar o substrato celulolítico em uma forma mais acessível, removendo celobiose sucessivamente das extremidades da cadeia. BERGHEM e PETTERSSON (1973) igualmente afirmaram que o componente C_1 é uma enzima hidrolítica que remove as unidades de celobiose de acordo com um mecanismo criterioso. Os resultados de seus estudos sugeriram que C_1 fosse de fato uma

celobiohidrolase.

• Adsorção e Dessorção da Celulase no Substrato Sólido

A adsorção das enzimas celulases e a formação do complexo enzima-substrato são consideradas um passo crítico na hidrólise enzimática da celulose (WALKER e WILSON, 1991). A adsorção da celulase ao material celulósico insolúvel foi descrita como irreversível (KRAULIS *et al.*, 1989), reversível (MOONEY *et al.*, 1999), ou semi-reversível (KLYOSOV *et al.*, 1980).

O mecanismo envolvido na ligação da celulase à celulose e o papel dos diferentes domínios da enzima na superfície do substrato ainda não são completamente compreendidos. SINITSYN *et al.* (1989) sugeriram que a celulase adsorvida na superfície da celulose executa um grande número de ações catalíticas enquanto se move ao longo do substrato. Segundo MOONEY *et al.* (1999), o que ocorre é uma aproximação mais dinâmica da enzima, tendo em sua ação catalítica uma dessorção do substrato e adsorção em uma outra parte do substrato.

MEDVE *et al.* (1997) observaram que a adsorção ao resíduo após a hidrólise conduz à perda de enzimas, enquanto BOUSSAID e SADDLER (1999) notaram que a hidrólise completa do substrato é requerida para que se tenha êxito na liberação das enzimas do substrato e se possa reutilizá-las com eficiência. RAMOS *et al.* (1993a) observaram que a melhor liberação das enzimas adsorvidas depende do conteúdo de lignina no substrato. NIDETZKY *et al.* (1994) postularam que, durante a degradação da celulose por um complexo de enzimas de *T. reesei*, a adsorção específica de cada componente individual da enzima aumenta gradualmente, não havendo preferência de um componente em alguma fase da hidrólise da celulose. Isto se apresenta em contradição a CONVERSE e OPTEKAR (1993), que relataram que a celobiohidrolase é adsorvida preferencialmente.

• Inibição e Desativação da Celulase

O complexo celulolítico pode perder a sua eficiência enzimática devido à inibição de suas enzimas pelo produto final e/ou através da desativação destas enzimas devido à agitação

mecânica.

• Inibição pelo Produto Final

É conhecido que as enzimas celulolíticas são inibidas pela celobiose, pela glicose, ou por ambos os produtos. Esta inibição foi assunto de pesquisa por muito tempo, com muitas opiniões sobre a natureza desta inibição. Alguns autores sugeriram que a inibição competitiva era dominante (GHOSE e DAS, 1971; GREGG e SADDLER, 1996), outros discutiram que a inibição não-competitiva era observada (HOLTZAPPLE *et al.*, 1984), enquanto alguns relataram uma combinação de ambas (GUSAKOV e SINITSYN, 1992).

KASTEL'YANOS *et al.* (1995) mostraram que a glicose inibiu a β -glicosidase, enquanto que a celobiose inibiu a endoglicanase e/ou celobiohidrolase. Quando a glicose foi adicionada à mistura reacional no início da hidrólise, a taxa da hidrólise diminuiu. O mesmo resultado foi observado na presença de celobiose, onde a taxa inicial de produção de glicose foi diminuída substancialmente. HOLTZAPPLE *et al.* (1990) relataram que todas as formas da enzima (livre, adsorvida e complexada) no processo de hidrólise da celulose estão sujeitas à inibição. Além disso, afirmaram que a inibição competitiva somente pode ser exibida se uma fração significativa da enzima existir como complexo enzima-substrato. Em seus estudos com a celulase de *T. reesei*, descobriram que este sistema celulolítico foi inibido não competitivamente pelos açúcares redutores, e as enzimas eram menos suscetíveis à inibição pelo produto final quando comparadas com as enzimas celulolíticas originárias de *Thermonospora* e *T. longibrachiatum*.

GUSAKOV e SINITSYN (1992) relacionaram a variação do modelo de inibição a alguns fatores chaves que incluem a concentração da enzima, a área superficial disponível da celulose e a atividade da β -glicosidase. Na maioria dos casos a inibição é competitiva ou não competitiva. Os autores relataram ainda que a relação da enzima/substrato era um fator muito importante e que dependendo da concentração da enzima, diferentes inibições pelo produto podem ser observadas.

GREGG e SADDLER (1996) relataram que a inibição pelo produto final torna visível a influência da taxa inicial da hidrólise com fatores tais como a recalcitrância crescente do

substrato, que reduz especialmente a taxa da reação e rendimento da hidrólise.

• Desativação Mecânica da Celulase

Acredita-se que geralmente as enzimas celulolíticas sejam suscetíveis à desativação quando o líquido reacional é exposto a uma agitação severa. OHLSON *et al.* (1984) afirmaram que a celulase de *T. reesei* apresenta uma boa estabilidade mecânica em um meio reacional agitado com o substrato livre, havendo uma perda de 8% da atividade da endoglicanase e de 10% da atividade da β -glicosidase após 1 semana.

GANESH *et al.* (2000) mostraram que, quando as enzimas celulasas foram sujeitadas à agitação, a desativação aumenta com um aumento na velocidade da agitação.

REESE e RYU (1980) sugeriram que essa desativação da enzima na interface gás-líquido é causada pelo desdobramento das moléculas da enzima nesta interface. Na ausência de agitação, a quantidade de enzima na interface é pequena comparada à concentração da enzima total, e conseqüentemente o efeito é insignificante. A agitação renova continuamente a superfície, sujeitando mais enzimas ao desdobramento, e conseqüentemente levando a um aumento da desnaturação e desativação (KAYA *et al.*, 1996).

• Transferência de Massa

Segundo GAN *et al.* (2003), na hidrólise enzimática ocorre a transferência de massa das moléculas de enzima através da camada estagnada de filme líquido que cerca as partículas sólidas de celulose e depois a difusão interna das moléculas de enzima na matriz sólida. A taxa de reação global pode ser influenciada por estas resistências à transferência de massa. No começo da hidrólise, no caso de reação em reator batelada agitado, a taxa de reação global é determinada pelas taxas de três eventos em seqüência: (1) a taxa de transferência de massa da enzima, (2) a taxa de adsorção da enzima na superfície do substrato e (3) a taxa de catálise da celulase. Com a continuação da hidrólise após a primeira fase de reação rápida, a taxa de reação global começa a depender da maior penetração da enzima e difusão dentro do substrato sólido.

A grande maioria dos autores, no entanto, ignoram a resistência à transferência de massa externa, que supõem insignificante em comparação com a catálise, mais lenta. Acredita-se que a importância da resistência à transferência de massa externa e interna deve ser vista em um ciclo dinâmico da enzima: difusão→adsorção→catálise→dessorção→difusão. Durante este processo interativo dinâmico, barreiras de transferência de massa causadas pela camada da película estagnante e a mudança estrutural do substrato poderia transformar-se em um significativo fator na determinação de taxa da reação. Também, a inibição da enzima depende da concentração de celobiose e glicose no meio, que depende por sua vez da eficiência da transferência de massa dentro do reator (GAN *et al.*, 2003).

VAN DYQUE Jr (1972), na tentativa de determinar a magnitude da resistência da transferência da celulase dentro um reator agitado, observou que a intensidade da agitação apresenta baixo efeito na hidrólise da celulose quando as partículas de celulose estão completamente suspensas. HUANG (1975) obteve resultados semelhantes em um estudo das limitações da transferência de massa externa. REESE (1992) considerou que a cinética lenta após o estado inicial reflete na dificuldade das enzimas difundirem e na sua união com o substrato.

• A Mudança Dinâmica da Reação Hidrolítica

Muitos estudos foram realizados em relação à modelagem da cinética de hidrólise, mas poucos se concentraram nas mudanças dinâmicas da natureza da cinética.

KLYOSOV e RABINOWITCH (1980) relataram que a etapa limitante pode mudar entre o começo da reação e após um determinado grau de conversão do substrato. As enzimas celulolíticas degradam a região amorfa mais acessível, mas são incapazes de atacar as regiões cristalinas menos acessíveis, conseqüentemente transformando a estrutura da celulose. Enquanto a cristalinidade aumenta durante toda a reação, a celulose torna-se cada vez mais resistente à hidrólise (FAN e LEE, 1983), afetando conseqüentemente a cinética do processo (WALKER e WILSON, 1991).

2.4.3.1.3. Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática dos materiais celulósicos para produção de açúcares tem sido proposta há muitos anos pelo seu elevado potencial energético. Entretanto, a aplicação comercial da hidrólise enzimática da celulose sempre esteve intimamente ligada ao alto custo da enzima, à lenta taxa de reação, e à falta de um sistema eficaz de reação para promover a catálise heterogênea.

Os materiais celulósicos são insolúveis, estruturados, e consistem de componentes que são resistentes à degradação enzimática. A hidrólise da celulose exige ações sinérgicas de diversos componentes da celulase em um sistema heterogêneo de reação. Estes fatos determinam que os mecanismos da reação hidrolítica são altamente complexos, tornando-a difícil para a modelagem matemática e às vezes incerta em relação à muitos parâmetros físicos, cinéticos e de transferência de massa (GAN *et al.*, 2003).

Dada a complexidade da degradação enzimática da celulose, a utilização de múltiplas enzimas envolvidas e a contínua mudança da biomassa durante o processo, não é difícil de acreditar que exista um grande número de modelos desenvolvidos para descrever este processo (BRANDT *et al.*, 1973; GHOSE, 1969; KING, 1966; LEE *et al.*, 1980).

Os modelos para reação de hidrólise enzimática podem ser classificados dentro de duas categorias: tipo de modelo (empírico ou mecanístico) e tipo de substrato (puro ou impuro). A maioria dos modelos mecanísticos para a reação de hidrólise enzimática são modelos de Michaelis-Menten com algum tipo de inibição ou modelos mais detalhados com múltiplas reações. Esses modelos geralmente consideram múltiplas reações devido à ação de diferentes tipos de enzimas ou diferentes substratos (cristalino ou amorfo) ou uma combinação dos dois. Os modelos mais simplificados incluem uma só expressão de velocidade de reação para a hidrólise, enquanto que os modelos que consideram múltiplas reações usam várias expressões de velocidade e muitos parâmetros.

Um grande grupo de modelos que descrevem a hidrólise enzimática da celulose pode ser definido como semi-empírico e envolve uma ou somente um pequeno grupo de variáveis da biomassa e geralmente apenas uma atividade enzimática, que representa simultaneamente a ação

das endoglicanases (EGs), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BG) (GAN *et al.*, 2003; HOWELL e MANGAT, 1978; HUANG, 1975; PEITERSON e ROSS, 1979; RYU *et al.*, 1982;). Somente alguns modelos envolvem uma única variável de estado do substrato e, ao mesmo tempo, distingue as três classes da enzima envolvidas (OKAZAKI e MOO-YOUNG, 1978).

A Tabela 2.7 apresenta as características cinéticas básicas, suposições, e modelagem aproximada de diversos modelos estabelecidos em diferente estágios de compreensão da complexa reação de hidrólise da celulose.

Tabela 2.7: Comparação de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulose (GAN *et al.*, 2003).

Estado do substrato	Sistema enzimático ^a	Abordagem cinética ^b	Tipo de inibição	Referências
Material homogêneo	E ₁₂	QSS	Competitiva	HOWELL e STUCK (1975)
Material homogêneo	E ₁₂₃	MM	Competitiva	HUANG (1975)
Grau de polimerização	E ₁ , E ₂ , E ₃	MM	Não-competitiva	OKAZAKI e MOO-YOUNG (1978)
Material homogêneo	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	HOWELL e MANGAT (1978)
Cristalino e amorfo	E ₁₂₃	MM	-	PEITERSEN e ROSS (1978)
Cristalino e amorfo	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	RYU <i>et al.</i> (1982)
Material homogêneo	E ₁₂ , E ₃	-	Não-competitiva	FAN e LEE (1983)
Ativo e inerte	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	GAN <i>et al.</i> (2003)

a E₁ – Endoglicanase; E₂ – Celobiohidrolase; E₃ – β -glicosidase; E₁₂ – Combinação de E₁ e E₂; E₁₂₃ – Combinação entre E₁, E₂ e E₃

b QSS – Estado quase-estacionário; MM – Michaelis-Menten

Como visto anteriormente, a reação da cinética de hidrólise enzimática da celulose está sujeita a inúmeros fatores. Além disso, a influência de cada fator é difícil de ser determinada isoladamente, já que um grande número de fatores estão relacionados na reação de hidrólise. Em síntese, um modelo matemático da cinética de hidrólise deve incorporar informações vitais no

que diz respeito ao mecanismo da reação, tentando incorporar todos os efeitos na reação heterogênea e evitando complicações desnecessárias.

2.4.4. Processos de Fermentação dos Materiais Lignocelulósicos

A conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, que envolve a hidrólise da celulose à glicose e a fermentação alcoólica deste açúcar, pode ser realizada simultaneamente em um só estágio ou sequencialmente em duas etapas. A Figura 2.20 apresenta as alternativas possíveis desta conversão.

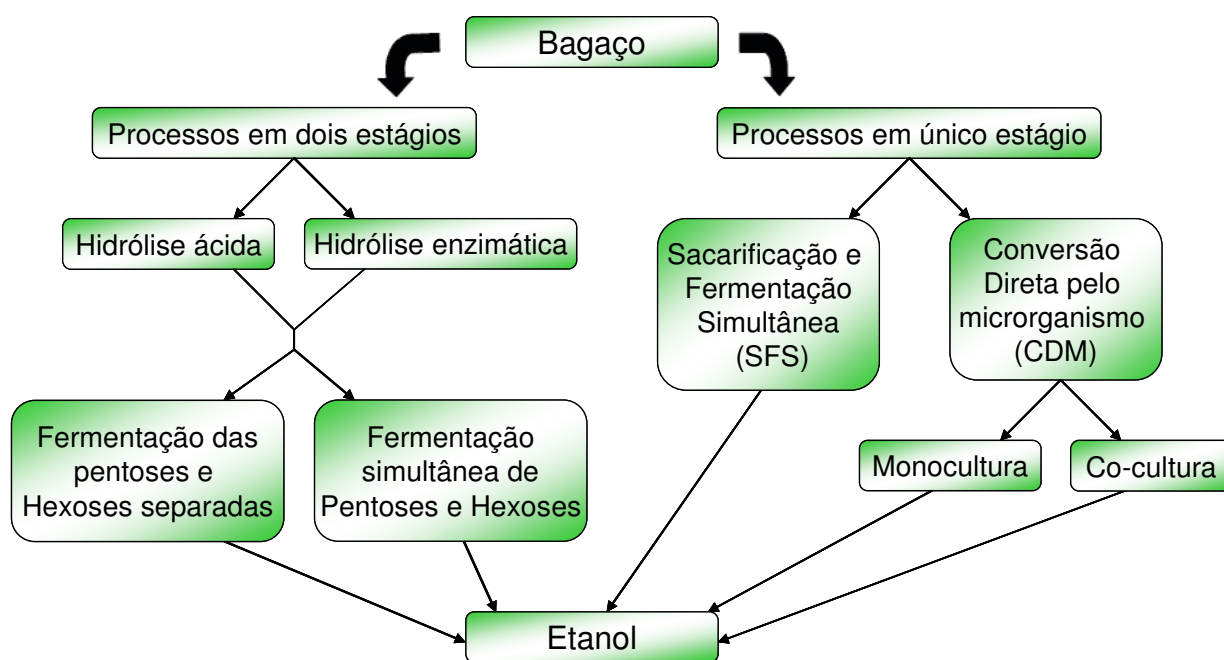


Figura 2.20: Rotas de hidrólise e fermentação (OGIER, 1999, DOMÍNGUEZ, 2003).

A abordagem que tem mostrado maior flexibilidade para controle das condições operacionais é o processo em duas etapas, onde a sacarificação (ácida ou enzimática) e fermentação são realizadas separadamente (HFS). A vantagem deste processo é que, ao estar separadas, a etapa de hidrólise e fermentação podem ser realizadas nas condições ótimas. No caso da hidrólise enzimática, a temperatura considerada ótima é a da enzima (em torno dos 50°C),

enquanto que a temperatura ótima da fermentação se dá pelo microorganismo produtor de etanol (30-34°C). A principal desvantagem do processo de HFS é a inibição das enzimas envolvidas no processo pela ação do produto final, como descrito anteriormente, levando a baixos rendimentos em etanol (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Nos processos em um único estágio, a hidrólise e a fermentação se realizam no mesmo reator. A principal vantagem destes processos é a redução da inibição pelo produto final que acontece na operação em duas etapas, já que a presença de microrganismos fermentativos junto com as enzimas celulolíticas reduz o acúmulo de açúcar no fermentador. Por este motivo se conseguem maiores taxas de hidrólise e porcentagens de conversão em comparação ao processo HFS, sendo necessária uma menor quantidade de enzimas para se obter um aumento dos rendimentos de etanol. A principal desvantagem deste processo está relacionada com as diferentes condições ótimas de pH e temperatura nas etapas de hidrólise e fermentação. Por este motivo se faz necessário realizar o processo numa condição compatível com as duas etapas. Considerando que a temperatura ótima de hidrólise enzimática está próxima dos 50°C e que as leveduras produtoras de etanol convencionais operam em torno dos 28-34°C, é recomendável a utilização de microrganismos termos-tolerantes para realizarem os processos em uma só etapa (ROSSELL, 2006a).

Os processos em uma única etapa podem ser dividir em dois grupos:

- Processos nos quais o mesmo microrganismo produz as enzimas e realiza a fermentação, conhecido como conversão direta pelo microrganismo (CDM);
- Processos com sacarificação e fermentação simultânea (SFS), no qual se empregam celulasas provenientes de um microrganismo celulolítico (normalmente um fungo do gênero *Trichoderma*), junto com a presença de um microrganismo produtor de etanol.

Nos processos CDM podem-se empregar monoculturas, sendo que um único microrganismo hidrolisa o material lignocelulósico e fermenta os açúcares a etanol. Para isto têm-se empregado bactérias do gênero *Clostridium*. Os rendimentos em etanol são baixos devido à formação de subprodutos, à baixa tolerância do microrganismo ao etanol e ao crescimento limitado do microorganismo nos hidrolisados devido à existência de produtos tóxicos tais como

ácidos acético e láctico (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996). Também podem ser empregadas co-culturas, nas quais se utilizam dois microrganismos. Um deles realiza a hidrólise da celulose (*Clostridium thermocellum*) e o outro microrganismo fermenta os açúcares produzidos.

A SFS combina a hidrólise enzimática e fermentação em um só reator, evitando a inibição da celulase pela glicose resultante da hidrólise. Este processo, no entanto, não evita a inibição causada pela celobiose, já que as leveduras industriais que fermentam glicose não conseguem fermentar celobiose. Esta abordagem leva a rendimento mais alto, menor tempo de fermentação e riscos menores de contaminação, devido à temperatura alta, presença de etanol e condições anaeróbicas. Apesar destas vantagens, a SFS tem alguns pontos negativos, entre eles as diferentes temperaturas ótimas para hidrólise (50°C) e fermentação (28-35°C) e a inibição dos microrganismos fermentativos e da celulase pelo etanol e por substâncias tóxicas vindas do pré-tratamento do material lignocelulósico (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Estudos realizados por BOLLÓK (1999) com o propósito de avaliar o desempenho do processo SFS, empregando linhagens do gênero *Kluyveromices*, mostraram as dificuldades para conduzir a fermentação alcoólica num ambiente termofílico. Os rendimentos de conversão se mostraram abaixo das expectativas, tendo o vinho final apresentado baixo teor alcoólico por causa da forte inibição por etanol formado quando se opera a temperaturas elevadas.

2.4.4.1. Fermentação Alcoólica do Hidrolisado Enzimático

A fermentação da glicose é um processo completamente estabelecido. Não existe microrganismo mais apropriado que a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, que através de seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica. Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados, a fermentação acontece sem maiores problemas (KIRALLY *et al.*, 2003).

Quanto à fermentação das pentoses, poucos microrganismos possuem a capacidade de fermentá-las a etanol. A transformação das pentoses em etanol é fundamental para atingir uma tecnologia eficiente de hidrólise. Para isso, estudos vêm sendo realizados para selecionar e

melhorar leveduras que fermentam naturalmente as pentoses a etanol. Além disso, desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Sacharomyces cerevisiae*, seleção de bactérias termofílicas e seleção de bactérias mesofílicas são outros pontos importantes de estudo (HO *et al.*, 1999).

Três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica das pentoses: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*. O desempenho das mesmas é muito limitado, já que o metabolismo das pentoses exige a presença de um nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado. Estas cepas apresentam baixa tolerância a etanol e aos ácidos alifáticos, tendo-se tentado como alternativas, a seleção de mutantes mais resistentes e a fusão de protoplastos (DU PREEZ *et al.*, 1989).

Os estudos para obtenção de linhagens geneticamente modificadas de *Sacharomyces cerevisiae* que possam metabolizar as pentoses estão focados na inserção de genes bacterianos que realizam a isomerização da xilose a xilulose (xilose isomerase), está última fermentescível pela *Sacharomyces*; inserção de genes que permitem a assimilação da xilose na *Sacharomyces cerevisiae* e isomerização da xilose a xilulose via a adição de uma isomerase (MONIRUZZAMAN *et al.*, 1997).

Quanto ao emprego de bactérias termofílicas, têm sido realizados estudos com *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Este organismo exige operar com mostos muito diluídos em pentoses. O *Clostridium thermohydrosulfuricum* tem sido amplamente estudado em processos CDM (Conversão Direta pelo Microrganismo). Dentre as dificuldades evidenciadas, há a formação significativa de acetatos que conduz a baixo rendimento alcoólico, baixa tolerância ao etanol e vulnerabilidade à presença de contaminantes.

Bactérias termofílicas geneticamente modificadas também têm sido estudadas visando evitar a formação de acetato em paralelo à formação de etanol. Os principais problemas relacionados ao emprego destas bactérias são: baixa tolerância ao etanol, forte sensibilidade aos inibidores, formação em paralelo de quantidade significativa de subprodutos e a necessidade de adicionar fatores de crescimento no mosto. Quanto à possibilidade de emprego de bactérias mesofílicas, certas bactérias como *Zymomonas mobilis* não são capazes de fermentar as pentoses, porém são muito eficientes no metabolismo da glicose a etanol através da via Entner-Doudoroff

(FLIEGE *et al.*, 1992).

Escherichia coli e *Klebsiella*, depois de submetidas a modificações genéticas, são as bactérias mesofílicas mais capazes de metabolizar as pentoses em ausência de oxigênio e são consideradas ótimas alternativas para fermentação alcoólica do licor de hidrólise.

Com o desenvolvimento da engenharia genética, ocorrerá uma melhoria na produtividade volumétrica, aumento da tolerância a etanol, eliminação de problemas de inibição durante a utilização de misturas ricas em glicose, e desenvolvimento de linhagens que são inteiramente resistentes aos produtos do hidrolisado, possibilitando assim a eliminação de todas as etapas de *clean-up* (INGRAM e DORAM, 1995).

2.4.4.2. Efeito dos Inibidores na Fermentação do Hidrolisado

Os produtos de degradação obtidos pelos pré-tratamentos químicos da biomassa podem ser divididos em ácidos carboxílicos, furanos, fenóis e sais inorgânicos, sendo que os fenóis apresentam um maior efeito inibitório durante a etapa de fermentação (McMILLAN, 1994). Os compostos orgânicos de baixo peso molecular são capazes de penetrar nas membranas das células, enquanto que os inibidores de fermentação com alto peso molecular influenciam na atividade dos açúcares e dos íons transportadores de elétrons para a membrana da célula. O mecanismo de inibição dos ácidos fracos, fenóis e furanos no crescimento do microrganismo e na produção do etanol tem sido objeto de estudo (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a). Compostos fenólicos de baixo peso molecular mostraram-se mais tóxicos para os microrganismos que os compostos polifenólicos (CLARK e MACKIE, 1984; SIERRA-ALVAREZ e LETTINGA, 1991). Segundo estudos realizados por RANATUNGA *et al.*, 1997 e TRAN e CHAMBERS, 1986, os extrativos (incluindo componentes fenólicos) também são capazes de inibir a fermentação. Os furanos e fenóis são compostos aromáticos que apresentam diferentes grupos funcionais, como por exemplo, ácido, cetona ou aldeído e, portanto, apresentam diferentes potenciais de atividade inibitória.

A Tabela 2.8 apresenta os principais compostos inibitórios da etapa de fermentação da glicose e do crescimento das leveduras (*S. cerevisiae*, *Candida shehatae*, *P. stipititis*) e bactérias

(*Z. mobilis*, *E. coli*, *T. mathranii*). O efeito inibitório dos compostos principais, como o 2-furfural, 5-hidroxiacetilfurfural e ácido acético são apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.8: Principais compostos inibitórios da etapa de fermentação de hidrolisado (adaptado de KLINKE *et al.*, 2004).

Compostos			
Ácidos	Aldeídos	Cetonas	Fenóis
Ácido 2-furóico	2-furfural	4-hidroxiacetofenona	Catecol
Ácido 4-hidroxibenzóico	5-hidroxiacetilfurfural	Acetovanilona	Hidroquinona
Ácido vanílico	4-hidroxibenzaldeído	Acetosiringona	Álcool coniferil
Ácido sirínico	Vanilina		Eugenol
Ácido 4-hidroxicinâmico	Iso-vanilina		Isoeugenol
Ácido ferúlico	Orto-vanilina		
Ácido acético	Siringaldeído		
Ácido fórmico	Coniferil aldeído		

Tabela 2.9: Efeito do furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético na etapa de fermentação. As porcentagens são dadas como resultado da fermentação após adição do inibidor em relação à fermentação de referência, sem adição do inibidor (adaptado de KLINKE *et al.*, 2004).

Inibidor	Conc. (mmol/L)	QEtOH ^a (%)	YEtOH ^b (%)	MIC (%)	Microrganismo ^d	Referências
2-furfural	10	NA	20	19	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	10	NA	82	81	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	21	NA	10	11	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	21	NA	86	NA	<i>S. cerevisiae</i> ATTC 96581	PALMQVIST <i>et al.</i> 1999
	21	NA	82	NA	<i>S. cerevisiae</i> Bakers	PALMQVIST <i>et al.</i> 1999
	21	NA	56	44	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	21	NA	131	NA	<i>C. shehatae</i> NJ23	PALMQVIST <i>et al.</i> 1999
	65	NA	50	NA	<i>S. cerevisiae</i> Bakers	LEE <i>et al.</i> 1999
5-hidroximetilfurfural	8	NA	35	29	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	24	NA	17	17	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	24	NA	87	69	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	40	NA	47	33	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	57	NA	50	NA	<i>S. cerevisiae</i> Bakers	LEE <i>et al.</i> 1999
Ácido acético	250	64	NA	79	<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	DELGENES <i>et al.</i> 1996
	283	78	NA	ND	<i>E. coli</i> LY01	ZALDIVAR <i>et al.</i> 2000
	435	110	119	74	<i>T. mathranii</i> A3	SOMMER 1998

NA: não analisado.

^aQ_{EtOH}: produtividade volumétrica de etanol na fase exponencial em relação à fermentação de referência.

^bY_{EtOH}: rendimento em etanol (g etanol/g glicose consumida) em relação à fermentação de referência.

^cMIC: concentração inibitória mínima.

^dCondições de Fermentação:

- *C. shehatae* NJ23: 30 g/L de glicose, 30°C, pH 5,5, frasco agitado (20 mL), 2,2 g/L inóculo (PALMQVIST *et al.*, 1999).
- *S. cerevisiae* ATCC 96581: 30 g/L de glicose, 30°C, pH 5,5, frasco agitado (20 mL), 3,2 g/L inóculo (PALMQVIST *et al.*, 1999).
- *S. cerevisiae* Bakers: 90 g/L de glicose, 30°C, pH 5, frasco agitado (50 mL), 10–20% (v/v) inóculo (LEE *et al.*, 1999), 30 g/L de glicose, 30°C, pH 5,5, frasco agitado (20 mL), 3,7 g/L de inóculo (PALMQVIST *et al.*, 1999).
- *S. cerevisiae* CBS 1200: 20 g/L de glicose, 30°C, pH 5,6, frasco agitado (50 mL), 3% (v/v de inóculo), 12 h (DELGENES *et al.*, 1996).
- *Z. mobilis* ATCC 10988: 20 g/L de glicose, 30°C, pH 5,6, frasco agitado (50 mL), 3% (v/v de inóculo), 24 h (DELGENES *et al.*, 1996).
- *C. shehatae* ATCC 22984: 20 g/L de xilose, 30°C, pH 5,6, frasco agitado (50 mL), 3% (v/v de inóculo), 32 h (DELGENES *et al.*, 1996).
- *E. coli* LY01: 100 g/L de xilose, 30°C, pH 7, 24 h (ácidos e álcoois) ou frascos agitados de 48 h (aldeídos). Etanol: 24 h (ácidos) ou 48 h (aldeídos e álcoois) (ZALDIVAR *et al.*, 2000).
- *T. mathranii* A3: 5 g/L de xilose, 70°C, pH 6,8, 48 h (SOMMER, 1998).

2.5. Aproveitamento dos Resíduos de Processo

Durante a produção de etanol de segunda geração existe a geração uma grande quantidade de águas residuais, como o licor de pré-tratamento, rico em pentoses, lignina solúvel e insolúvel, e a vinhaça; além de eventuais resíduos sólidos resultantes após a etapa de hidrólise enzimática, constituído principalmente de lignina e hemicelulose não hidrolisáveis.

Um dos importantes desafios da produção do etanol lignocelulósico é a utilização de todos os resíduos de processo, visando uma perfeita integração energética, maximizando o valor econômico da biomassa, reduzindo o desperdício e se tornando um importante instrumento de mitigação de emissões dos gases do efeito estufa. Assim, é de suma importância que estes resíduos sejam aproveitados, o que acarretará em uma maior viabilização do processo produtivo.

Uma alternativa interessante para a utilização dessas águas residuais é a produção de biogás, que pode ser uma solução sustentável para a remoção da matéria orgânica residual nos efluentes, além da possibilidade de utilização deste novo efluente como adubo residual em solo agrícola (LIU *et al.*, 2006; TORRY-SMITH *et al.*, 2003). Uma opção para a lignina é utilizá-la na produção de calor/energia através da sua queima direta em caldeiras.

2.5.1. Produção de Biogás

Hoje, em todo o mundo, fatores como a disponibilidade de energia, a otimização de processos e as crescentes exigências ambientais vêm promovendo o desenvolvimento sustentável para o acompanhamento do crescimento econômico dos países. Os sistemas energéticos baseados em fontes renováveis de energia vêm contribuindo com esse objetivo, cumprindo um papel importante na substituição do petróleo e derivados.

Dentre essas fontes, destaca-se o biogás, cuja captura e combustão representa uma forma relativamente simples de reduzir emissões de metano, disponibilizar um combustível e até gerar uma receita adicional por meio da geração de créditos de carbono mediante a implantação de projetos de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL).

2.5.1.1. Formação do Biogás

O biogás é uma mistura gasosa combustível, produzida através da digestão anaeróbia, processo fermentativo que tem como finalidade a remoção de matéria orgânica, a formação de biogás e a produção de biofertilizantes ricos em nutrientes. Sua produção é possível a partir de diversos resíduos orgânicos, como esterco de animais, lodo de esgoto, lixo doméstico, resíduos agrícolas, efluentes industriais e plantas aquáticas (PECORA, 2006).

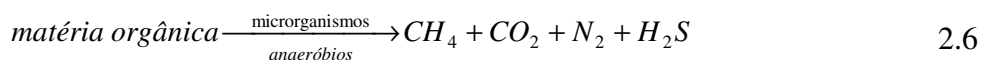
A composição típica do biogás é de aproximadamente 60% de metano, 35% de dióxido de carbono e 5% de uma mistura de hidrogênio, nitrogênio, amônia, ácido sulfídrico, monóxido de carbono, aminas voláteis e oxigênio (WEREKO-BROBBY e HAGEN, 2000). Dependendo da eficiência do processo, influenciado por fatores como pressão e temperatura durante a fermentação, o biogás pode conter entre 40% e 80% de metano.

O poder calorífico do biogás depende do teor de metano e do grau de umidade do gás. O valor freqüentemente adotado para o biogás (metano 60%) é de 22,99 MJ/m³. Porém, se o gás for desumidificado e o dióxido de carbono removido, seu valor aproxima-se ao do metano puro, isto é, 29,26 MJ/m³. O poder calorífico líquido, entretanto, depende da eficiência dos equipamentos empregados no uso energético do gás (COELHO *et al.*, 2001).

A umidade presente no biogás tem influência direta no processo de combustão, afetando a temperatura de chama, limites de inflamabilidade, diminuição do poder calorífico e taxa ar-combustível do biogás.

2.5.1.2. Aspectos Microbiológicos

A degradação microbiológica de matéria orgânica em um ambiente anaeróbio só pode ser obtida por microrganismos capazes de utilizar moléculas, ao invés de oxigênio, como receptores de hidrogênio. A reação pode ser simplificada como mostra Equação 2.6.



Na verdade, a degradação anaeróbia da matéria orgânica é, quimicamente, um processo bastante complicado, envolvendo centenas de possíveis compostos e reações intermediárias, cada uma catalisada por enzimas e catalisadores específicos. As bactérias atuam simbiótica e sinergeticamente, utilizando a matéria orgânica de forma assimilativa para o crescimento (PRICE e CHEREMISINOFF, 1981).

No tratamento anaeróbio de efluentes, após a diminuição da quantidade de oxigênio, começam a predominar microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, aqueles que preferencialmente não usam oxigênio na decomposição da matéria orgânica, podendo, porém, utilizá-lo. Segundo FORESTI (1999), estas bactérias, primeiramente, convertem o material orgânico particulado em compostos dissolvidos, num processo denominado hidrólise ou liquefação, sendo esta conhecida como a primeira fase da produção do biogás. Já as moléculas complexas como celulose, proteína, amido e gordura, que compõem a matéria orgânica, possuem tamanho consideravelmente grande para penetrar no interior das células bacterianas, podendo somente ser degradadas sob a ação de enzimas hidrolíticas extracelulares (celulases, hemicelulases, dentre outras).

Os oligômeros e os monômeros assim formados, de tamanho suficientemente pequeno para penetrar no interior das células, são então metabolizados. A passagem da membrana citoplasmática se faz por duas vias: difusão passiva segundo o gradiente de concentração ou por transporte ativo das proteínas membranáceas. No interior das células, estes substratos são então metabolizados, em função do equipamento enzimático da célula, à ácidos orgânicos, cetonas, álcoois, NH_3 , H_2 e CO_2 . Esta segunda fase é conhecida como acidificação ou acidogênese.

Do ponto de vista bioquímico, percebe-se que a hidrólise e a fase ácida constituem duas etapas distintas. Por outro lado, microbiologicamente, verifica-se que as bactérias não podem sobreviver somente da fase de hidrólise, visto que tudo acontece no exterior da célula. São, portanto, as mesmas bactérias que realizam as duas fases, agrupadas por esta razão em uma só fase. Estas bactérias são anaeróbias estritas ou facultativas, porém na sua maioria são anaeróbias

estritas. Esta segunda fase se caracteriza, portanto, por ser um processo bioquímico pelo qual as bactérias obtêm energia pela transformação da matéria orgânica hidrolisada (PECORA, 2006).

Ainda durante esta segunda fase, há a produção de quantidades consideráveis de compostos orgânicos simples e de alta solubilidade, principalmente ácidos graxos voláteis. Na Tabela 2.10 estão listadas algumas espécies de bactérias que participam da fase acidogênica, isoladas em digestores anaeróbios, especificando quais componentes elas degradam.

Os metabólitos finais das bactérias hidrolíticas acidogênicas são excretas das células e entram em solução no meio. Eles passam, então, a ser substratos das bactérias acetogênicas, constituindo assim uma terceira fase: a acetogênese.

As bactérias acetogênicas produzem o hidrogênio como metabólito obrigatório e desempenham um importante papel entre a acidogênese e a metanogênese (quarta fase). Estas bactérias são capazes de converter ácidos graxos com mais de 2 carbonos a ácido acético, gás carbônico e hidrogênio, sendo estes os substratos para as bactérias metanogênicas. Nesta fase, o efluente possui alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), valor usado para indicar a concentração de matéria orgânica em um dado volume líquido. Os valores de DBO são superiores a 10 g/L (PINTO, 1999). Um outro indicador da quantidade de compostos orgânicos em um líquido é a Demanda Química de Oxigênio (DQO), índice que mede a quantidade necessária de oxigênio, fornecido por um agente oxidante, necessária para oxidar totalmente a matéria orgânica presente no meio

Na quarta e última fase, os compostos orgânicos simples formados na fase acetogênica, são consumidos por bactérias estritamente anaeróbias, denominadas bactérias metanogênicas, que dão origem ao metano e ao gás carbônico. Estas bactérias metanogênicas desenvolvem-se preferencialmente em valores de pH próximos do neutro, entre 6,8 e 7,3. O fluxograma geral do processo de decomposição anaeróbio é mostrado na Figura 2.21.

Tabela 2.10: Bactérias não-metanogênicas isoladas em digestores anaeróbios (PRICE, 1981).

	Celulose	Amido	Proteínas	Gorduras		Celulose	Amido	Proteínas	Gorduras
<i>Aerobacter aerogenes</i> *					<i>Micrococcus luteus</i>				X
<i>Alcaligenes bookerii</i>				X	<i>Micrococcus varians</i>		X	X	
<i>Alcaligenes fecalis</i>	X				<i>Micrococcus ureae</i>		X		
<i>Bacillus sp</i> *					<i>Paracolobacterium intermedium</i>			X	
<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>	X				<i>Paracolobacterium coliforme</i>			X	
<i>Bacillus cereus</i>		X	X		<i>Proteus vulgaris</i>	X			
<i>Bacillus circulans</i>	X	X	X		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X			
<i>Bacillus firmus</i>			X		<i>Pseudomonas ambigua</i> *				
<i>Bacillus knelfelhampi</i> *					<i>Pseudomonas oleovorans</i>				X
<i>Bacillus megaterium</i>	X	X	X	X	<i>Pseudomonas perolens</i>				X
<i>Bacillus pumilis</i>			X		<i>Pseudomonas pseudomallei</i> *				
<i>Bacillus sphaericus</i>			X	X	<i>Pseudomonas reptilivora</i>	X			
<i>Bacillus subtilis</i>			X	X	<i>Pseudomonas riboflavina</i>	X			
<i>Clostridium carnofoetidum</i>	X				<i>Pseudomonas spp.</i>	X	X	X	X
<i>Escherichia coli</i>		X	X		<i>Sarcina cooksonii</i> *				
<i>Escherichia intermedia</i> *					<i>Streptomyces bikiniensis</i>				X
<i>Micrococcus candidus</i>		X							

*Incerteza quanto ao elemento de degradação.

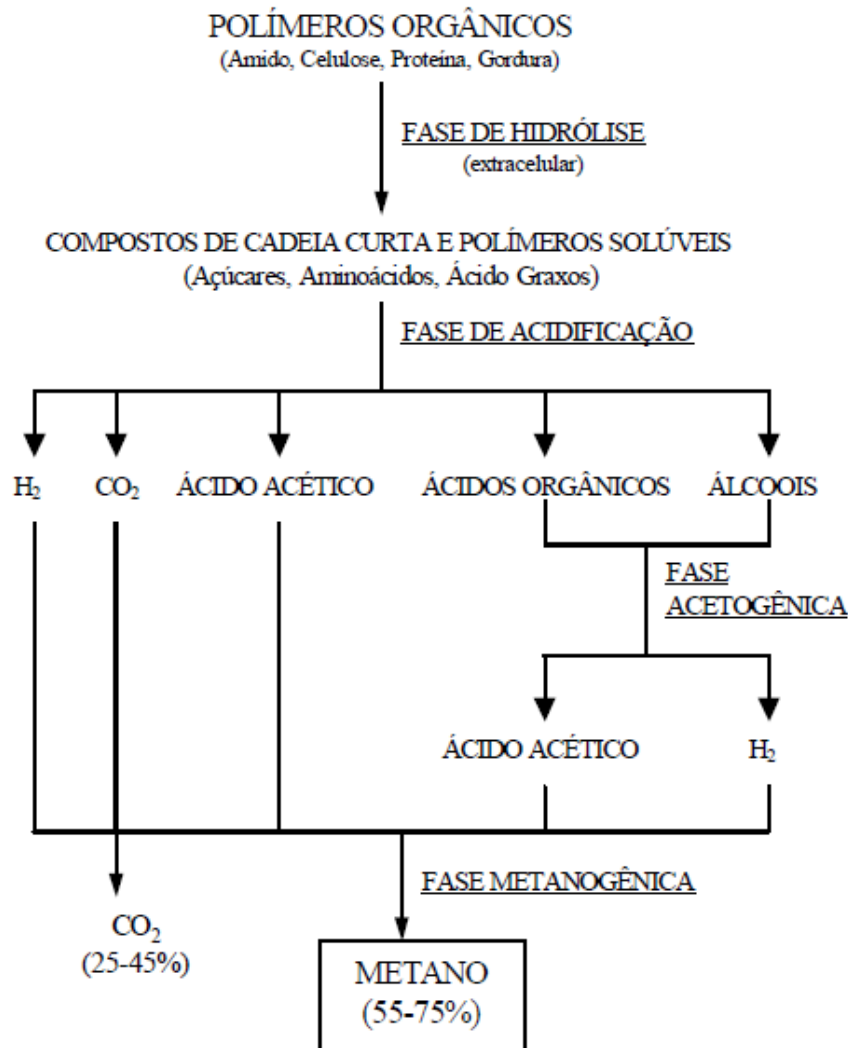


Figura 2.21: Etapas da fermentação anaeróbica para produção de metano (CNI, 1982).

Os grupos bacterianos envolvidos nos processos estão misturados e esta diversidade depende basicamente do tipo de matéria orgânica adicionada ao digestor. As bactérias formadoras de ácidos são bastante resistentes e capazes de suportar súbitas mudanças das condições externas e de alimentação, ao contrário das bactérias metanogênicas, bastante suscetíveis a alterações das condições. Um fato importante a se observar sobre a população de bactérias no biodigestor é que elas são interdependentes e simbióticas. As bactérias formadoras de ácido asseguram que o meio está livre de oxigênio e produzem o alimento básico para as bactérias metanogênicas, além de

suas enzimas agirem sobre proteínas e aminoácidos, liberando sais de amônia, as únicas fontes de nitrogênio que as bactérias metanogênicas aceitam. Estas, por sua vez, embora não possam viver sem as formadoras de ácidos, removem os produtos finais do metabolismo das primeiras e os convertem em gases, que escapam do sistema. Caso esta conversão não se processasse, as condições no biodigestor se tornariam tão ácidas que matariam as bactérias formadoras de ácidos (PINTO, 1999).

2.5.1.3. Fatores que Influenciam a Geração de Biogás

Resumem-se a seguir os principais parâmetros da digestão anaeróbia relacionados à geração de biogás.

- **Temperatura**

A atividade enzimática das bactérias depende estritamente da temperatura, visto que é conhecido que alterações bruscas de temperatura causam desequilíbrio nas culturas envolvidas, principalmente nas bactérias formadoras de metano.

Os microrganismos devem ser adaptados à faixa de temperatura de trabalho, o que permite classificá-los também com relação a este parâmetro. As bactérias psicrófilas, ou seja, aquelas que operam em uma faixa inferior a 20°C, praticamente não são capazes de produzir biogás. As bactérias termófilas, que operam a uma faixa acima de 45°C, apresentam taxas de conversão maiores e, assim, um menor tempo de residência do resíduo no digestor, além do seu volume poder ser menor, reduzindo-se os custos iniciais (PINTO, 1999).

Estudos mostram que na faixa de 55 a 70°C, a celulose e outros polímeros alcançam as maiores taxas de hidrólise (PINTO, 1999). Apesar disso, a maior parte dos digestores trabalha na faixa mesofílica (35 a 37°C), por se tratar de uma temperatura operacional mais confiável, não necessitando de um controle brusco de temperatura.

- **pH**

A concentração em íons H_3O^+ no meio tem uma grande influência sobre o crescimento dos microrganismos. O pH do processo deve ser mantido entre 6 e 8, podendo ser considerado ótimo de 7 a 7,2. O controle do pH é função do acúmulo de bicarbonato, da fração de gás carbônico, da concentração de ácidos voláteis ionizados e da concentração de nitrogênio sob a forma de amônia (CASTILHOS JUNIOR, 2000).

Inicialmente, as bactérias formadoras de ácidos fracionam a matéria orgânica e produzem ácidos voláteis, resultando em um aumento da acidez do meio e uma redução do pH. Quando as bactérias metanogênicas começam a agir, transformam os ácidos em metano, neutralizando o meio e elevando o pH. Outro fator que tende a elevar o pH é o teor de amônia, que aumenta quando as proteínas começam a ser digeridas. Um terceiro fator atuante sobre o pH do meio, agindo de modo a estabilizá-lo, é o bicarbonato. A concentração do íon bicarbonato é diretamente proporcional ao teor de dióxido de carbono e ao pH do meio. Assim, se as bactérias do primeiro grupo são muito rápidas e produzem mais alimentos do que as metanogênicas conseguem digerir, o dióxido de carbono liberado tornará maior a concentração de bicarbonato, o que impede a queda acentuada do pH. No decorrer da degradação do material orgânico em um sistema fechado, o pH tende a se elevar e a produção de metano tem o seu pico máximo (PINTO, 1999).

Se o conteúdo de um digestor em operação torna-se muito ácido, o método mais comum para restaurar o pH ideal é interromper sua alimentação por alguns dias. Isto dá um tempo para as bactérias metanogênicas reduzirem a concentração dos ácidos voláteis. Em digestores de grande porte, nos quais a interrupção da alimentação é complicada devido a problemas de estocagem do resíduo, o pH é usualmente elevado pela adição de hidróxido de cálcio (PINTO, 1999).

- **Composição e Concentração do Resíduo**

A composição do resíduo afeta diretamente a produção de biogás, ou seja, quanto maior for o conteúdo de sólidos voláteis, os quais representam a quantidade de sólidos orgânicos

presentes na amostra, e a disponibilidade de nitratos, fosfatos e sulfatos, maior é a produção de metano. Além disso, a produção é diretamente proporcional à demanda química de oxigênio (DQO) (PINTO, 1999).

Os substratos devem prover as fontes de alimento aos microrganismos, particularmente os oligo-elementos, como o cálcio, magnésio, potássio, sódio, zinco, ferro, cobalto, cobre, molibdênio e manganês. Em fortes concentrações, estes elementos apresentam um efeito inibidor sobre o processo de fermentação. Por outro lado, os elementos majoritários como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre têm uma importância fundamental no rendimento dos gases de fermentação.

A presença de nitrogênio sob a forma de proteína é favorável, pois a mineralização conduz à amônia, que é útil no estabelecimento da alcalinidade. Nutrientes essenciais, como o ferro, e os micronutrientes, como o níquel e o cobalto, demonstram efeitos positivos na produtividade de metano. Em compensação, o enxofre, presente em grandes quantidades, aumenta a produção de H_2S , o que prejudica a produção do biogás (CORTEZ e LORA, 1997).

Certos íons orgânicos, como o K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , amônia iônica NH_4^+ , Mg^{2+} e S^{2-} apresentam, na fermentação, uma propriedade singular: quando em pequenas quantidade resultam em um poder estimulante ao metabolismo celular, manifestando, porém, propriedades inibidoras do mesmo metabolismo quando presentes em concentrações mais elevadas. Ainda não é completamente conhecido o fenômeno da inibição; acredita-se que, em maiores concentrações, os íons atravessem a delicada membrana celular, interferindo no mecanismo biológico da célula (MOTTA, 1986).

A Tabela 2.11 apresenta as concentrações de inibição para cada um dos principais íons durante o processo de fermentação.

A relação carbono/nitrogênio do substrato é fundamental para que haja a formação dos ácidos orgânicos que serão transformados pelas bactérias metanogênicas em biogás. A proporção ideal está em torno de 1:30 ou 1:20. Valores acima ou abaixo deste intervalo proporcionam perdas significativas ao processo de biodigestão (CASTILHOS JUNIOR, 2000).

Uma das vantagens da digestão anaeróbia reside justamente na diversidade de substratos passíveis de sofrer fermentação. As bactérias metanogênicas não exigem substâncias ou matérias específicas para sua operação; diferentemente do substrato necessário para a produção de etanol, uma vez que as enzimas somente se desenvolvem a partir de açúcares.

Tabela 2.11: Concentrações e fator de inibição do processo de fermentação (CASTILHOS JUNIOR, 2000).

Íons	Concentração (mg/L)		
	Estímulo	Inibidor	
		Fraco	Forte
Sódio Na^+	100 a 200	3.500 a 5.500	8.000
Potássio K^+	200 a 400	2.500 a 4.500	12.000
Cálcio Ca^{2+}	100 a 200	2.500 a 4.500	8.000
Magnésio Mg^{2+}	75 a 150	1.000 a 1.500	3.000
Nitrogênio NH_4^+	5 a 200	1.500 a 3.000	3.000
Sulfetos S^-	-	menos de 200	200
Ni^{2+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}	-	-	100

• Agitação

A agitação leva a um maior contato do substrato com as bactérias, distribuindo melhor o calor na biomassa e dando maior uniformidade aos produtos intermediários e finais da biodigestão, além de evitar a produção de uma crosta que pode obstruir a parte superior do biodigestor (PINTO, 1999).

RODRIGUES *et al.* (2003), estudaram a influência das taxas de agitação mecânica sobre o desempenho de um reator anaeróbio de esgoto doméstico, baseando-se na análise da demanda química de oxigênio (DQO). Os resultados mostram que a agitação permite a redução do tempo total do ciclo para a produção do biogás.

Segundo SOUZA (2008), a agitação do substrato aumenta significativa a produção volumétrica de metano, devido ao fato que na falta de agitação há uma formação de microbolhas

de gases, principalmente CO₂, que aprisionam grande número de bactérias, impedindo a atuação das mesmas no processo de degradação.

Apesar da melhora no rendimento, a etapa de agitação envolve custos, tanto fixos, devido à implantação do sistema, quanto variáveis, decorrentes da operação do mesmo. Assim, é fundamental analisar a real importância desta etapa em relação a todos os parâmetros de processo, tanto na produção do biogás quanto na redução da carga orgânica.

- **Tempo de Retenção Hidráulica (TRH)**

O Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) é o tempo necessário para a mistura ser digerida no digestor, o que ocorre quando a produção de gás é máxima, definindo o ponto de melhor qualidade do biogás no processo de biodigestão anaeróbia. O tempo de retenção é determinado, num processo contínuo, pela relação entre volume do digestor e o volume diário de carga introduzida, isto é, de matéria orgânica adicionada (MAGALHÃES, 1986).

O tempo de retenção influi diretamente no rendimento do biodigestor devido ao fato de que a retirada precoce do substrato resulta em ineficiência pela não utilização de todo o potencial da matéria orgânica, enquanto que a retirada tardia significa ineficiência por perda de tempo desnecessário.

2.5.1.4. Tratamento do Biogás

O processo a ser empregado para a purificação do biogás depende da sua composição e aplicação, características físicas, energia e recursos disponíveis, subprodutos gerados e do volume do gás a ser tratado. Assumindo um grau de purificação suficiente do biogás, este pode ser utilizado em todas as aplicações projetadas para gás natural (ZICARI, 2003).

A remoção do gás carbônico diluído no metano permite elevar o poder calorífico do biogás e facilita a compressão do mesmo (JENSEN e JENSEN, 2000). Já a remoção do sulfeto de

hidrogênio evita a deterioração prematura das máquinas transformadoras de energia, pois quando misturado com água, forma ácido sulfídrico que é altamente corrosivo.

ZICARI (2003) divide os processos de purificação do biogás em 5 categorias:

- Absorção por um líquido,
- Adsorção por um sólido,
- Separação por diferença de permeabilidade em membrana,
- Conversão química em outro componente,
- Condensação.

Utilizando módulos capilares com membranas de poliimida, HARASIMOWICZ *et al.* (2007) obtiveram o enriquecimento de metano a partir de concentrações de 55-85% até 91-94,4%. O material de membrana resistente a pequenas concentrações de gases ácidos garantiu a redução do sulfeto de hidrogênio e das concentrações de vapor de água.

OSORIOA e TORRESB (2009) estudaram uma nova forma para a purificação do biogás. Além de torres de lavagem, operação comum para purificação de gases, os autores utilizaram filtros de carvão ativado. O biogás, efluente das torres de lavagem, apresentou uma concentração de sulfeto do hidrogênio menor que 1,0 ppm. Valores próximos a zero ou mesmo valores indetectáveis foram obtidos em até 58 análises consecutivas do sistema.

2.5.1.5. Biofertilizante

O efluente, outro subproduto da digestão anaeróbia, apresenta uma alta qualidade para o uso como fertilizante agrícola, pois contém matéria orgânica com teor reduzido de carbono, devido à formação de metano e gás carbônico, e alto teor de fósforo. Seu grau avançado de decomposição faz com que o solo absorva com maior facilidade os nutrientes.

Estudos mostram os benefícios da utilização do efluente da produção de biogás em substituição aos fertilizantes químicos na produção de mandioca, espinafre, plantas aquáticas, entre outras culturas (MOOG *et al.*, 1997; PRESTON e RODRIGUEZ, 2002).

PERES (2007) ressalta que apesar de muitos benefícios efetivamente existentes no biofertilizante, ainda não se tem conhecimento de resultados dessa aplicação na cultura de cana-de-açúcar.

2.5.2. Lignina como Subproduto

A lignina é um subproduto industrial gerado, hoje em dia, principalmente pela indústria de papel e celulose. O lignosulfonato e lignina Kraft são os principais tipos de lignina comerciais disponíveis em grandes quantidades no mercado.

A lignina Kraft é obtida a partir da precipitação de licor negro gerado durante o processo de polpação com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio em digestores. As condições de temperatura, agitação e acidez influenciam significativamente nas propriedades finais de lignina. Este processo é aplicado em diferentes tipos de madeira levando a um polímero com peso molecular de 1,1 kg/mol aproximadamente (MANSOURI e SALVADO, 2006).

Os lignosulfonatos são gerados em um processo chamado *Howard*, sem a adição de hidróxido de cálcio ao licor negro, através de três etapas, nas quais são geradas e recicladas em cada uma delas o sulfeto de cálcio, lignosulfonato cálcico e lignosulfonato com excesso cal. Posteriormente, os lignosulfonatos passam por um processo de aquecimento na presença de cálcio ou hidróxido de sódio durante o qual ocorre a dessulfonação. A lignina é recuperada durante a hidrólise por oxidação do precipitado obtido devido ao meio básico, embora outros tipos de separações sejam possíveis, como a ultrafiltração e osmose reversa. O polímero lignosulfonato tem um peso molecular de 1,3 kg/mol (MANSOURI e SALVADO, 2006).

Outra forma de lignina bastante usual é a organosolv, obtida após tratamento da biomassa com solventes orgânicos em processos de deslignificação, tais como metanol, etanol, ácido acético e ácido fórmico. As ligninas derivadas da polpação com álcoois estão comercialmente disponíveis em quantidades limitadas. Este polímero pode alcançar pesos moleculares de até 2,8 kg/mol (MANSOURI e SALVADO, 2006).

A lignina hidrolisada vem sendo bastante difundida durante os últimos anos devido ao interesse pela obtenção de açúcares e seus produtos de fermentação. Ela pode ser modificada por

cloração e nitração, de forma similar às ligninas alcalinas, formando cloroligninas e nitroligninas que podem ser utilizadas como fertilizantes, aditivo de resinas, goma e agente adesivo em painéis conglomerados.

Outra forma difundida da lignina é a sua forma oxidada, que pode ser obtida de forma seletiva e sob condições suaves para a formação de produtos aromáticos oxigenados (CHANG e ALLAN, 1971). Aproveitando o caráter aromático da lignina, é possível introduzir grupos funcionais oxigenados mais polares, principalmente grupos carbonílicos e carboxílicos. Os produtos funcionalizados obtidos podem ser utilizados em sínteses e polimerizações. A oxidação da lignina em meio básico já está consolidada, sendo industrialmente limitada à produção de vanilina a partir de lignosulfonatos obtidos no processo de polpação com sulfito (MANSOURI e SALVADO, 2006).

A lignina obtida após etapas de pré-tratamentos, seja para produção de celulose e papel ou para produção de etanol celulósico, pode ser precipitada de amostras de licor negro utilizando ácidos concentrados (GONÇALVES *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 1987).

2.5.2.1. Aplicações da Lignina

A maior utilização para a lignina, após seu isolamento da biomassa, é a obtenção de energia através da sua queima direta em caldeiras. No caso da lignina ser obtida após pré-tratamentos alcalinos ou oxidativos, esta normalmente apresentará um menor conteúdo de carbono e maior de oxigênio, o que acarretará em uma redução no seu poder calorífico. O poder calorífico da lignina extraída da madeira é de 23 a 25 MJ/kg (LONGUE JUNIOR, 2007).

Ligninas alcalinas obtidas a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos têm sido quimicamente modificadas visando agregar valor ao polímero (GANDINI e BELGACEM, 2008; SOUZA, 2006).

Estudos mostram a importância das ligninas alcalinas como resina colante na composição das fibras de bagaço de cana-de-açúcar na elaboração de painéis. Por ser um material natural da própria fibra vegetal, seu aproveitamento após modificações químicas é desejável (SOUZA, 2006).

Algumas aplicações alternativas para a lignina têm sido estudadas por diversos autores (ADLER, 1977; BALLERINI *et al.*, 2000; BELGACEM e GANDINI, 2008; FERNANDEZ, 2006; GANDINI, 2008; GOHEEN e HOYT, 1981; GONZALEZ-SERRANO *et al.*, 1997; NORTHEY, 1992) sendo as principais:

- Estabilizador em emulsões de líquidos imiscíveis,
- Sequestro de íons metálicos em plantas de tratamento de água, evitando a reação destes íons com outros compostos que devem permanecer dissolvidos,
- Dispersante, sendo os lignosulfonatos úteis em cimento, argila e cerâmica, tintas e pigmentos, placas de gesso, pesticidas e inseticidas, etc,
- Adesivo. Muito eficientes e econômicas, as resinas fenólicas atuam como aglomerante em pellets, sendo úteis em briquetes, cerâmicas, isolamento de fibra de vidro, fertilizantes e herbicidas, estabilizadores de solo, dentre outros,
- Matéria-prima para a produção de carvão ativado, utilizado como adsorvente no campo da eletrônica, catálise, armazenamento de gases e, principalmente, nos processos separação, purificação de efluentes gasosos e líquidos e processos de recuperação, devido à sua textura porosa com elevada capacidade de adsorção.

2.6. Biorrefinaria da Cana-de-Açúcar

O termo biorrefinaria é relativamente novo e refere-se à conversão da biomassa em uma gama de produtos, com pouco desperdício e mínimas emissões. É aplicado à indústria que transforma materiais brutos de fonte renovável (bagaço de cana, bambu, palha de cereais, madeira, licor negro Kraft, etc), em produtos de maior valor agregado (energia, materiais e produtos químicos). Fabricando produtos múltiplos, a biorrefinaria permite maximizar o valor derivado da matéria-prima (FERNANDO *et al.*, 2006; JONG *et al.*, 2005).

Especialistas acreditam que as biorrefinarias possam vir a constituir uma indústria-chave do século XXI, responsável até mesmo por uma nova revolução industrial, em virtude da

importância das tecnologias que empregam e dos efeitos sobre o paradigma industrial (ONDREY, 2006).

Visando tornar realidade este conceito, estudos têm sido constantes em empresas, universidades e centros de pesquisa do mundo inteiro, especialmente na América do Norte e Europa.

No Brasil, a Oxiteno S.A. Indústria e Comércio, empresa petroquímica pertencente ao Grupo Ultra, que tem como principal negócio a produção de derivados de óxido de eteno e solventes oxigenados, é a primeira empresa brasileira do setor químico a explicitar a definição de um projeto de implantação de uma biorrefinaria para obter produtos hoje derivados do petróleo com base no bagaço e na palha da cana-de-açúcar (INOVAÇÃO UNICAMP, 2006).

Além disso, o Governo Federal brasileiro tem investido em ciência e tecnologia ligada ao etanol de cana, esperando obter no futuro um combustível com alta produtividade, visando o aproveitamento máximo de matéria-prima e proporcionando a sustentabilidade do setor. Recentemente foi inaugurado em Campinas o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia. O laboratório nacional visa colaborar para a manutenção da liderança brasileira na produção sustentável de etanol de cana-de-açúcar aplicando os conceitos de biorrefinaria (CTBE, 2010).

O uso da palha de trigo para a produção de bioetanol, biogás e biohidrogênio tem sido demonstrado com sucesso por alguns autores (FAN *et al.*, 2006; KAPARAJU *et al.*, 2009; LINDE *et al.*, 2007). A co-produção de bioetanol com outros biocombustíveis, como o biogás, por exemplo, a partir de culturas energéticas como o centeio, a canola e a fava também já foram demonstradas (PETERSSON *et al.*, 2007).

A produção de bioetanol, biohidrogênio e biogás a partir da palha de trigo foi estudada dentro do conceito de biorrefinaria (KAPARAJU *et al.*, 2009). Inicialmente, a palha de trigo foi hidrotermicamente pré-tratada para liberação de uma fração sólida rica em celulose e uma fração líquida rica em hemicelulose. A celulose, então submetida à hidrólise enzimática e fermentação, resultou na produção de 0,41 g etanol/g glicose. O licor de pré-tratamento foi submetido à fermentação por microrganismos anaeróbios e houve a produção de 178,0 mL H₂/g açúcares. Os efluentes da produção de bioetanol e do biohidrogênio foram ainda utilizados para a produção de

metano, apresentando rendimentos de 0,324 e 0,381 m³/kg sólidos voláteis, respectivamente. Os autores observaram que a multiprodução de combustíveis foi energeticamente mais eficiente quando comparada com a produção de apenas um combustível, aumentando assim a eficiência da biomassa.

BAUER *et al.* (2009), realizaram um estudo comparativo do potencial energético da produção de um único biocombustível com um processo combinado, baseado no conceito de biorrefinaria. Inicialmente a palha de trigo foi pré-tratada por explosão a vapor, sendo avaliadas como variáveis o tempo e temperatura. O pré-tratamento da palha de trigo por explosão a vapor aumentou significativamente a produção de metano por digestão anaeróbia em até 20% ou um máximo de 331 L/kg de matéria volátil, em comparação com palha de trigo não tratada.

Visando a produção de múltiplos combustíveis, foi realizado um estudo para analisar o potencial de biodigestão anaeróbia da vinhaça obtida após a produção de etanol a partir da palha de trigo pré-tratada. O rendimento máximo de etanol por kg de palha de trigo seca pré-tratada por explosão a vapor seguida de hidrólise enzimática foi estimado em 0,200 kg, sob condições de pré-tratamento à 200°C e 10 min, correspondente a 80% do valor máximo teórico. A produção de metano a partir da vinhaça foi estimada em 183 L/kg de palha de trigo seca. Com base nestes dados, os autores demonstraram que a produção de duas formas de energia foi mais satisfatória do ponto de vista energético, já que o etanol pode ser considerado como um combustível de alta qualidade e o processo proposto proporciona um metano de qualidade para as centrais de cogeração com produção de energia elétrica e vapor utilitário, que por sua vez pode ser usado para operar colunas de destilação no próprio processo.

A maioria dos esforços em biorrefinaria está focado na área de produção de energia, incluindo os biocombustíveis. Deve-se ressaltar que a biomassa anualmente produzida no planeta é insuficiente (< 30%) para atender à demanda de energia hoje proveniente do petróleo. Grandes investimentos terão que ser realizados no aumento da produção de biomassa. Embora a demanda mundial de biomassa para a produção de materiais e de produtos químicos seja muito pequena, não mais que 6% daquela necessária à produção de energia, existe muito interesse também nestes produtos, dado os seus elevados valores agregados, em alguns casos (BASTOS, 2007).

Exemplos destes incluem os chamados produtos químicos verdes já usados em larga escala como o xilitol, ácido succínico e seus derivados; produtos bioativos, utilizados nas indústrias de alimentos saudáveis (sitostanol); e indústria farmacêutica e cosmética, como os flavonóides, estilbenos, lignanas e outros antioxidantes.

Dentre os materiais, destacam-se os bioplásticos, resinas furânicas, derivados de hemiceluloses, fibras de carbono, carbono ativo, resinas fenólicas e emulsões betuminosas derivadas de lignina, e outros biopolímeros, tais como ácido polilático, nanocristais, etc.

Nos últimos trinta anos, o Brasil atuou praticamente sozinho no desenvolvimento de um mercado estável de etanol e apenas nesta década surgem novos mercados à custa de forte intervenção, incentivos e subsídios. O etanol de cana-de-açúcar apresenta expressivas vantagens comparativas de custo de produção, sendo de 30% a 50% inferior ao custo do etanol norte-americano a partir do milho e três quartos do etanol europeu a partir da beterraba. Os custos atuais de produção dos processos que empregam a biomassa lignocelulósica ainda são elevados. No entanto, a intensa mobilização de empresas, universidades e o enorme apoio público nos países desenvolvidos, com concessão de diversos incentivos, prometem resultados auspiciosos num horizonte não muito distante e a instalação de biorrefinarias se tornará uma realidade no cenário futuro do mercado de energia e produtos químicos.

CAPÍTULO 3

PREPARAÇÃO E ANÁLISE PRÉVIA DA BIOMASSA E ENZIMAS

Neste capítulo são apresentadas todas as metodologias empregadas na preparação e caracterização química do bagaço de cana e das enzimas celulase e β -glicosidase, além dos resultados relacionados a esta preparação, como análise compositiva de cada biomassa a ser estudada, análise das atividades enzimáticas e de seus efeitos sob o pH e a temperatura do meio.

3.1. Introdução

O conhecimento da composição química da biomassa é de suma importância para a compreensão de suas propriedades e para a sua correta utilização, especialmente quando se destina às transformações químicas, como é o caso da produção de etanol de segunda geração.

Os procedimentos para a análise química estão normalizados por alguns órgãos, como a TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), uma das mais conhecidas e referenciadas, e as normas adotadas pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory). Além disso, pesquisadores brasileiros vêm desenvolvendo e padronizando uma norma específica para análise do bagaço de cana-de-açúcar (GOUVEIA *et al.*, 2009).

Em se tratando das enzimas, a atividade enzimática é extremamente dependente do meio em que se encontra, principalmente do pH e da temperatura. A diminuição da velocidade de uma

reação enzimática ocorre devido a vários fatores, tais como a desativação da enzima pela temperatura ou pH no qual a reação decorre, a inibição da enzima pelos produtos de reação e a diminuição do grau de saturação da enzima pelo substrato. Sabe-se que todas as enzimas são afetadas pelo pH do meio e consequentemente ativas em uma pequena faixa de pH, apresentando um valor ótimo correspondente à atividade máxima. O mesmo comportamento pode ser observado para a temperatura, sendo a diminuição da atividade catalítica devido a alteração da estabilidade da enzima, da velocidade de transformação do complexo enzima-substrato e da afinidade entre substrato e enzima (RICARDO e TEIXEIRA, 1976).

Conhecer estas condições ótimas é de fundamental importância para obter um bom rendimento no processo.

3.2. Materiais

3.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de análise da composição química do material e determinação da atividade enzimática e dos efeitos do pH e temperatura do meio nesta, foram utilizados os reagentes químicos listados na Tabela 3.1.

Além dos reagentes, outros materiais de consumo foram necessários para a realização dos experimentos:

- Membrana GS em éster de celulose com poro de 0,22 μm e 13 mm de diâmetro da marca Millipore;
- Membrana HA em ésteres de celulose com 0,45 μm e 47 mm de diâmetro da marca Millipore;
- Seringa descartável Braun Injekt 12 mL;
- Seringa Hamilton 25 μL ;
- Suporte para filtração swinnex em polipropileno com 13 mm de diâmetro, autoclavável, da marca Millipore.

Tabela 3.1: Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido acético	Chemco	99,7
Ácido cítrico monohidratado	Dinâmica	99,5
Ácido dinitro-3,5-salicílico	Vetec	99
Ácido sulfúrico	Synth	96,5
Álcool etílico	Synth	99,5
Carbonato de cálcio	Synth	99,0
D-(+)-celobiose	Fluka	≥99,0
D-arabinose	Sigma-Aldrich	>98,0
D-glicose	Merck	≥ 99,0
D-manose	Chem service	≥ 99,0
D-xilose	Fluka	≥99,0
5-hidroximetilfurfural	Chem service	99,5
Fenol	Vetec	99
Furfural	Chem service	99,3
Papel de filtro n° 1	Whatman	-
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95
Kit Glicose GOD-PAP	Laborlab	-
Meta-bissulfito de sódio	Ecibra	97
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado	Synth	99

3.2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a execução dos experimentos foram:

- Agitador eletromagnético da marca Produtest e peneiras circulares padronizadas da série de Taylor das marcas granuteste e bertel;
- Aparato soxhlet modelo MA – 188 da marca Marconi;
- Autoclave vertical modelo AV 50 da marca Phoenix;
- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostatzado modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$;

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;
- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Espectrofotômetro UV Mini-1240 Shimadzu com precisão na quarta casa decimal;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Estufa para secagem de plantas da marca Blue M. Electric Company;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS TecnoPON, com precisão de 0,01;
- Micro moinho de faca modelo MA – 630/1/E da marca Marconi;
- Mufla modelo Q-318D24 da marca Quimis;
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

3.2.3. Biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi proveniente de uma mesma safra e fornecido pela Usina São Luiz – Dedini S/A agroindústria da fazenda São Luiz – Setor A, da zona rural da cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo. O material é proveniente da safra de 2005/06, obtido por colheita manual da cana queimada e resultante da última moenda após a extração do caldo.

3.2.4. Enzimas

Foram utilizadas as enzimas celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). As atividades enzimáticas, e o pH e temperatura ótimas, foram determinados experimentalmente.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Preparação e Análise da Biomassa

3.3.1.1. Secagem da Biomassa

Antes da armazenagem, o bagaço foi seco em uma estufa para secagem de plantas a 45°C por 48 h e deixado à temperatura ambiente por mais 24 h, sendo posteriormente armazenado no freezer em bolsas hermeticamente fechadas.

Durante o processo de secagem, alíquotas do material foram coletadas e secas em outra estufa a 105°C por 24 h para a determinação do teor de unidade do material. A metodologia de análise está descrita no *apêndice I*. As amostras foram coletadas e analisadas em três momentos: bagaço antes de qualquer processo de secagem e após 24 e 48 h de secagem. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.1.2. Separação da Biomassa Seca

Após o processo de secagem e armazenagem do bagaço no freezer, a biomassa foi dividida em duas partes. Uma parte foi armazenada sem peneirar, sendo denominada de bagaço não peneirado. A outra parte do material foi peneirada e analisada granulometricamente. Este segundo material foi chamado de bagaço peneirado.

Os bagaços não peneirados e peneirados foram utilizados como substrato nos experimentos de pré-tratamento e hidrólise com o objetivo de analisar a influência do tamanho da partícula na liberação dos açúcares fermentescíveis.

Para obter a fração peneirada, foi realizada uma separação granulométrica do bagaço passando o material por peneiras da série de Taylor com aberturas de 12, 16, 24, 32, 42, 60 e 80 mesh, como descrito no *apêndice II*.

Segundo MACHADO (2000), as fibras do bagaço de cana representam o material retido em peneiras com poros de 0,991 mm de abertura (16 mesh) e a medula, o material retido na

peneira com poros de 0,248 mm de abertura (60 mesh). Assim, para conseguir um material peneirado constituído de parte fibrosa e medular, foi utilizada, para os experimentos com o bagaço peneirado, uma mistura do material das peneiras de -12+60 mesh, representando assim um substrato de diâmetro médio igual a 0,823 mm. O material retido na peneira de 80 mesh e na parte inferior foi descartado, uma vez que apresentava grandes quantidades de terra.

3.3.1.3. Caracterização Química da Biomassa

Para a análise da composição química do bagaço não peneirado e peneirado, certa quantidade de cada biomassa foi passada por um moinho de facas até conseguir um material com partículas inferiores a 0,5 mm, selecionadas através de uma peneira de 20 mesh. Partículas retidas na peneira eram novamente moídas para que a composição química do material não fosse alterada.

Após moagem dos materiais e separação granulométrica, estes foram analisados quanto ao teor de cinzas, extrativos, lignina total (lignina insolúvel + solúvel), celulose, hemicelulose e grupos acetil.

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a metodologia descrita no *apêndice III*. A metodologia para quantificação dos extrativos está descrita no *apêndice IV* e a determinação do conteúdo de carboidratos, lignina e grupos acetil foram realizadas segundo o procedimento descrito no *apêndice V*.

3.3.2. Determinação da Atividade Enzimática

Antes de iniciar o estudo aplicando as enzimas celulase e β -glicosidase, ensaios foram realizados destinando-se a determinação das atividades enzimáticas.

Para a enzima celulase, a atividade foi determinada como atividade de papel de filtro e expressa em unidades de papel de filtro (FPU) (em inglês, Filter Paper Units) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (ADNEY e BAKER, 1996; GHOSE, 1987;

WOOD e BHAT, 1988). O *apêndice VI* apresenta toda a metodologia para o preparo do tampão citrato, do reagente DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico) e determinação da atividade enzimática da celulase.

Para a β -glicosidase, a medida da atividade foi determinada através de uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU) (em inglês, Cellobiose Units) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (WOOD e BHAT, 1988). O *apêndice VII* descreve a metodologia detalhada para essa análise.

3.3.3. Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Enzimática da Celulase

Para analisar o efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática foi utilizada uma solução da enzima celulase de concentração 3% (v/v). O procedimento padrão para a determinação do efeito do pH é apresentado no *apêndice VIII*. O *apêndice IX* apresenta o procedimento padrão para o cálculo do efeito da temperatura na atividade enzimática.

3.3.4. Métodos Analíticos para Quantificação dos Açúcares

3.3.4.1. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART)

As concentrações de ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) descrito por MILLER (1959), utilizado para a quantificação destes açúcares liberados durante a análise da atividade enzimática da celulase (*apêndice VI*) e na determinação do efeito do pH (*apêndice VIII*) e da temperatura (*apêndice IX*) na atividade enzimática.

Açúcares redutores são aqueles que possuem grupos carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (SILVA *et al.*, 2003).

O método DNS baseia-se na redução do ácido dinitro-3,5-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo

carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada sendo lida espectrofotometricamente a 540 nm.

A reação ocorrida para a quantificação dos ART é apresentada na Reação 3.1.

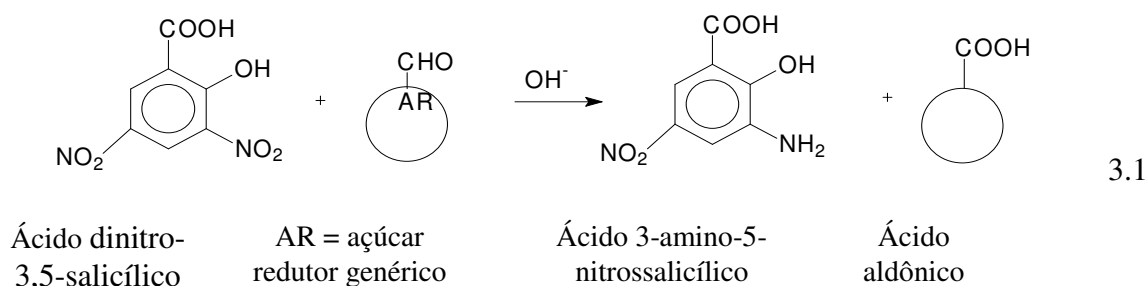


Figura 3.1: Reação para quantificação de açúcares redutores totais por DNS.

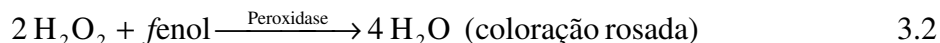
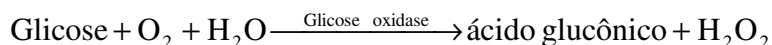
Entretanto, a equivalência entre o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico produzido e a quantidade do açúcar não é exata e diferentes açúcares produzem diferentes intensidades na cor desenvolvida. Isso sugere que a química da reação deva ser mais complexa que a apresentada, podendo estar relacionada com as reações de decomposição de açúcares em solução alcalina (MILLER, 1959).

3.3.4.2. Determinação da Concentração de Glicose pelo Método GOD-PAP

Para a análise da atividade enzimática da β -glicosidase, a concentração de glicose foi determinada de acordo com o método enzimático Glicose GOD-PAP, descrito por HENRY (1974). O procedimento padrão para esta análise foi descrito no *apêndice VII*.

O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é subsequente usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (PAP).

A Reação 3.2 representa as reações enzimáticas ocorridas para a quantificação da glicose.



3.3.4.3. Determinação da Concentração dos Carboidratos e Inibidores

Para análise da composição química do bagaço, a concentração dos monossacarídeos glicose, xilose, arabinose e manose, do dissacarídeo celobiose, e dos inibidores de maior possibilidade de formação, como o furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético, obtidos após a hidrólise ácida, foram determinados através de CLAE. O procedimento padrão foi descrito no *apêndice V, itens 6-9*.

3.4. Resultados e Discussões

3.4.1. Cálculo do Teor de Umidade do Bagaço de Cana-de-Açúcar

Antes de iniciar os experimentos, o bagaço foi seco e analisado em relação ao teor de umidade como descrito no *apêndice I*. A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos para os teores de umidade das amostras sem nenhum processo de secagem e após 24 e 48 h de secagem.

Tabela 3.2: Porcentagem de umidade no bagaço em cada uma das etapas de secagem.

Secagem	Massa média do bagaço úmido (g)	Massa média do bagaço a.s. *(g)	% umidade
Não seco	6,0050 ± 0,0022	2,3899 ± 0,0173	60,20 ± 0,28
Após 24 h	5,9961 ± 0,0102	5,5781 ± 0,0148	6,97 ± 0,41
Após 48 h	6,0024 ± 0,0041	5,7036 ± 0,0042	4,98 ± 0,02

*a.s.: absolutamente seco

Analisando a Tabela 3.1 nota-se que o bagaço de cana-de-açúcar apresentava um teor de umidade inicial de 60,20%. Vale ressaltar que o teor médio de umidade do bagaço de cana-de-açúcar está em torno de 50%.

Nota-se que após 24 h de secagem, o teor de umidade do bagaço passou de 60,20% (amostra antes da secagem) para 6,97%, havendo uma redução de 88,42% da umidade inicial. Após 48 h de secagem, o bagaço teve seu teor de umidade diminuído, passando para 4,98%.

Após as 48 h de secagem, o bagaço permaneceu 24 h a temperatura ambiente não havendo mudanças significativas no seu teor de umidade (5,01%). O principal objetivo da secagem do material é minimizar a proliferação de microrganismos que possam degradar/fermentar o material.

3.4.2. Análise Granulométrica

Após a separação e análise granulométrica do bagaço, a fração mássica retida foi calculada e o valor médio destes resultados estão dispostos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Fração mássica retida após análises em triplicata.

Peneiras	dp (mm)*	Diâmetro médio da partícula (mm)	Média da massa de bagaço retida (g)	Fração mássica retida (%)
+12	>1,397	1,689	75,23 ± 5,96	85,59 ± 2,89
-12+16	0,9910	1,194	2,77 ± 0,39	3,13 ± 0,08
-16+24	0,7010	0,8460	2,50 ± 0,43	2,82 ± 0,33
-24+32	0,4950	0,5980	1,53 ± 0,34	1,72 ± 0,22
-32+42	0,3510	0,4230	1,60 ± 0,57	1,77 ± 0,41
-42+60	0,2480	0,3000	1,57 ± 0,38	1,75 ± 0,22
-60+80	0,1750	0,2120	1,30 ± 0,94	1,38 ± 0,82
-80	<0,1750	0,1500	1,73 ± 1,32	1,83 ± 1,20

*Valores retirados do Apêndice C-8, PERRY *et al.* (1997).

Pode-se observar, analisando a Tabela 3.3, que a maior parte do bagaço de cana utilizado nos experimentos como bagaço não peneirado, cerca de 85,59%, apresenta um diâmetro médio superior a 1,689 mm.

A Figura 3.2 mostra a aparência do bagaço não peneirado e peneirado utilizado nos experimentos.



Figura 3.2: Bagaço não peneirado e peneirado.

3.4.3. Análise da Composição Química do Bagaço

Após quantificação dos constituintes do bagaço não peneirado e peneirado, os resultados foram calculados e dispostos na Tabela 3.4.

Analisando a Tabela 3.4 nota-se que a soma dos componentes atingiu cerca de 93-94% para os dois tipos de bagaço. Isso se deve ao fato de que alguns compostos presentes no material não foram quantificados, como os ácidos urônicos e alguns compostos inibidores. Além disso, deve-se considerar uma quantidade significativa de terra no material.

Tabela 3.4: Composição química do bagaço não peneirado e peneirado.

Composição química	Bagaço não peneirado (%)	Bagaço peneirado (%)
Cinza	1,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Extrativos	0,6 ± 0,3	2,3 ± 0,1
Lignina total	26,4 ± 0,2	29,3 ± 1,6
Celulose	40,5 ± 1,6	34,9 ± 0,9
Hemicelulose	24,5 ± 0,4	22,7 ± 0,3
Total	93,6 ± 2,0	93,0 ± 1,1

Os valores obtidos na análise estão, de um modo geral, dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Normalmente não são encontrados valores fixos para cada análise, mas sim uma faixa de valores. Isso ocorre porque a constituição final de cada planta sofre vários tipos de influência, como por exemplo, espécies da cana-de-açúcar, clima (temperatura, umidade), constituição do solo, infecção e pragas, método de plantio, época de colheita e outros, fazendo com que plantas de mesma espécie apresentem composições diferentes.

A primeira vista, analisando a Tabela 3.4 e comparando com a constituição química média do bagaço de cana (Tabela 2.1), parece que o bagaço não peneirado apresenta em sua constituição uma maior quantidade de fibras, ao contrário do bagaço peneirado, cuja composição química assemelha-se mais com a parte medular da planta.

3.4.4. Atividades das Enzimas Celulase e β -Glicosidase

A Figura 3.3 apresenta o comportamento da enzima celulase para a determinação da atividade enzimática.

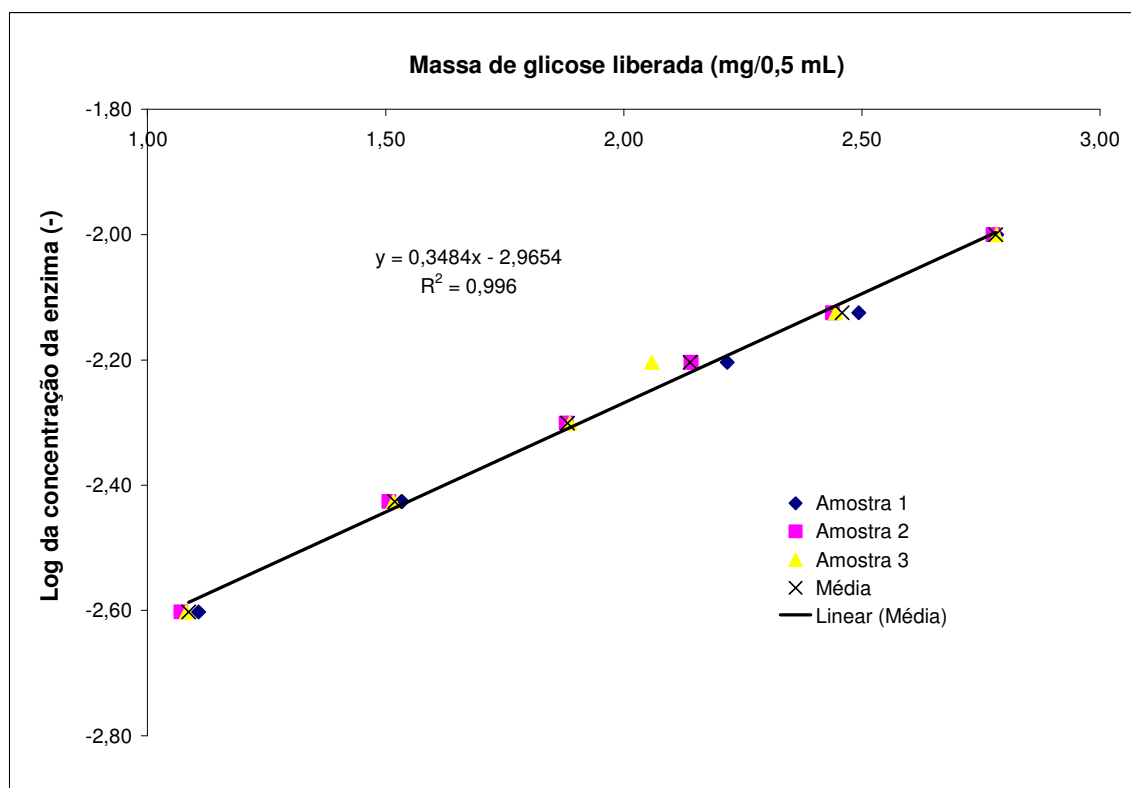


Figura 3.3: Comportamento da enzima celulase.

Segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação. Sendo assim, com a equação da reta obtida na Figura 3.3, foi possível determinar a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg:

$$\text{Log [enzima]} = (0,3484 \times 2,0) - 2,9654$$

$$\text{Log [enzima]} = -2,2686$$

$$[\text{enzima}] = \underline{\underline{5,39 \times 10^{-3}}}$$

Com o valor da concentração da enzima determinada, pode-se calcular a atividade enzimática da celulase através da Equação VI-1, *apêndice VI*.

$$\text{Atividade da celulase} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot 5,39 \times 10^{-3})} = \underline{\underline{68,68 \text{ FPU/mL}}}$$

A atividade da enzima β -glicosidase foi determinada em triplicata de acordo com a metodologia descrita no *apêndice VII*. A liberação de glicose em função da concentração de enzima pode ser observada na Figura 3.4.

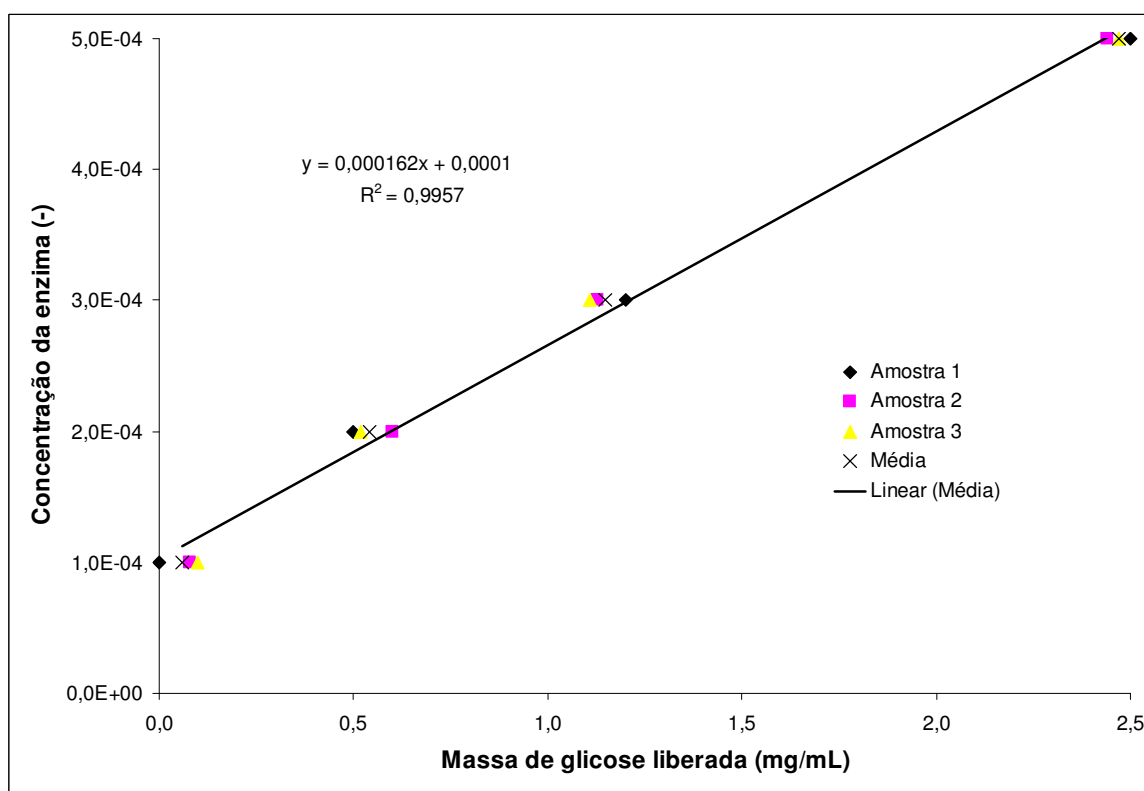


Figura 3.4: Comportamento da enzima β -glicosidase.

Segundo WOOD e BHAT (1988), uma unidade da atividade de β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose, convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. Sendo assim, com a equação da reta obtida na Figura 3.4, foi possível determinar a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose:

$$\begin{aligned} [\text{enzima}] &= (0,000162 \times 1,0) + 0,0001 \\ [\text{enzima}] &= \underline{\underline{0,000262}} \end{aligned}$$

Com o valor da concentração da enzima determinada, pode-se calcular a atividade enzimática da β -glicosidase através da Equação VII-1, *apêndice VII*.

$$\text{Atividade da } \beta\text{-glicosidase} = \frac{0,5}{(0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot 0,000262)} = \underline{\underline{350,29 \text{ CBU/mL}}}$$

Assim, o valor da atividade da celulase obtido foi de 68,68 FPU/mL da enzima original e da enzima β -glicosidase foi de 350,29 FPU/mL da enzima original. Estes valores de atividade foram utilizados para calcular o volume necessário das enzimas a serem adicionadas no processo de hidrólise. Vale ressaltar que de tempos em tempos (aproximadamente 3 meses) ou a cada novo lote de enzimas, a atividade era novamente determinada.

3.4.5. Efeito do pH na Atividade Enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado a partir da massa de glicose liberada pela enzima celulase diluída, em tampão citrato, a diferentes valores de pH. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no *apêndice VIII*.

A Tabela 3.5 mostra a atividade enzimática e a atividade enzimática relativa obtida após

quantificação da glicose liberada pela enzima celulase em diferentes valores de pH. A atividade enzimática relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a um determinado pH e a atividade enzimática inicial máxima.

Tabela 3.5: Efeito do pH na atividade enzimática.

pH	Atividade Enzimática (FPU)	Atividade Relativa %
1,58	1,881	7,950
3,12	12,42	52,48
4,10	19,36	81,81
4,80	23,66	100,0
5,21	23,25	98,26
5,75	22,04	93,13
6,14	20,87	88,20
6,99	18,66	78,87

Ao analisarmos a Tabela 3.5 percebe-se que o pH onde a enzima apresentou maior atividade (pH ótimo) foi 4,8. A enzima apresenta-se menos ativa em valores de pH < 4,8, apresentando-se praticamente inativa em pH 1,58. Observa-se ainda uma estreita faixa onde a enzima apresenta alta atividade, aproximadamente entre valores de pH 4,80-5,75.

Assim, para os experimentos de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado, o meio reacional teve seu valor de pH ajustado para 4,8, uma vez que este representa o valor em que a atividade da enzima é máxima.

3.4.6. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado segundo a metodologia descrita no *apêndice IX*. A Tabela 3.6 apresenta os valores das temperaturas estudadas em cada um dos ensaios juntamente com a atividade enzimática e relativa.

Tabela 3.6: Efeito da temperatura na atividade enzimática.

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (FPU)	Atividade Relativa (%)
10	2,054	28,15
20	3,058	41,91
30	4,682	64,17
40	6,078	83,30
45	7,068	96,86
50	7,297	100,00
55	7,210	98,82
60	6,760	92,64
70	4,720	64,68
80	2,825	38,72

Ao analisarmos a Tabela 3.6 percebe-se que a temperatura onde a enzima apresenta maior atividade (temperatura ótima) foi de 50°C. Em condições extremas de temperatura, a atividade enzimática diminui bruscamente. Observa-se ainda que a temperatura ótima apresenta-se numa faixa aproximadamente entre 45 e 55°C.

Logo, para a etapa de hidrolise enzimática foi utilizada uma temperatura reacional de 50°C, já que esta apresentou o maior valor de atividade enzimática.

3.5. Conclusões

O bagaço de cana-de-açúcar, obtido por colheita manual da cana queimada e resultante da última moenda após a extração do caldo, apresentou um teor de umidade inicial de 60,20%, bem acima do valor normalmente observado (aproximadamente 50,0%). Após secagem por 48 h, a biomassa permaneceu com um teor de 4,98%.

Através da análise granulométrica foi possível observar que aproximadamente 85,59% do bagaço denominado como bagaço não peneirado apresenta um diâmetro médio superior a 1,689 mm. Nesta porção observou-se uma grande heterogeneidade de tamanhos de fibra.

Em se tratando da composição química dos dois materiais a serem estudados, os resultados apresentaram-se condizentes com valores da literatura, mesmo sabendo que não

existem valores fixos para cada constituinte da biomassa, mas sim uma faixa deles. Além disso, foi observado que o bagaço não peneirado apresentou em sua constituição uma maior quantidade de fibras, ao contrário do bagaço peneirado, cuja composição química assemelha-se mais com a parte medular da planta.

O efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática também foi estudado neste capítulo. A enzima celulase apresentou um pH ótimo a 4,8 sendo mais sensível à valores de $\text{pH} < 4,8$ e apresentando-se praticamente inativa em pH 1,58. Em se tratando da temperatura, a maior atividade para a celulase foi observada a 50°C, apresentando quedas bruscas de atividade em condições extremas de temperatura.

CAPÍTULO 4

ESTUDO E COMPARAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULA

Neste capítulo, é apresentado um estudo inicial das condições de pré-tratamento visando à comparação de dois tamanhos de partícula: o bagaço de cana não peneirado e peneirado. Foram utilizados como agentes de pré-tratamento o hidróxido de cálcio (cal) e o peróxido de hidrogênio alcalino, levando em consideração os efeitos da variável tempo de pré-tratamento, temperatura e concentração do reagente em relação a sua eficiência em liberar os açúcares fermentescíveis após hidrólise enzimática. Os resultados foram analisados mediante um planejamento estatístico linear através de software estatístico comercial. O principal objetivo foi analisar cada um dos pré-tratamentos e determinar a necessidade ou não de reduzir o tamanho das partículas da biomassa para melhorar a liberação dos açúcares fermentescíveis após a etapa de hidrólise enzimática. Além disso, procurou-se analisar as variáveis do processo que se apresentaram estatisticamente significativas para uma posterior otimização das condições de pré-tratamento.

4.1. Introdução

O processo de produção de etanol a partir do bagaço demanda a transformação da celulose em monômeros de glicose e subsequente conversão dos mesmos, por microrganismos, em etanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose torna-se muito recalcitrante à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão. Assim, a etapa de pré-tratamento é considerada imprescindível

para aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos.

Os pré-tratamentos químicos são conhecidos por removerem a lignina sem causar grandes danos à cadeia celulósica que deve apresentar propriedades adequadas para sua posterior utilização. Como a lignina está quimicamente ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial destas ocorre no processo de pré-tratamento. Além disso, há uma diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, associada com o inchaço da amostra, aumentando assim a porosidade do material.

A estrutura da lignina é modificada pela presença de substâncias alcalinas, tornando-a mais solúvel. Esta modificação ocorre porque a lignina é degradada em unidades menores, por clivagem das ligações interunidades, sendo, em seguida, os grupos hidrofílicos (por exemplo, OH⁻) introduzidos no polímero e fragmentos clivados.

A deslignificação alcalina é acompanhada pela degradação dos carboidratos (celulose e hemicelulose), podendo levar a perdas consideráveis de açúcares caso as condições não sejam bem controladas. A reação de degradação dos carboidratos continua até a introdução de um grupo carboxílico na cadeia final (RAMIREZ, 2005).

Em se tratando do pré-tratamento com hidróxido de cálcio, os íons Ca⁺ são depositados na matriz celulósica na forma de carbonato de cálcio. Segundo LÓPEZ (2000), é possível observar a deposição do cálcio através de microscopia eletrônica de varredura, microanálise de raios-X, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV) e análise termogravimétrica.

A formação de fragmentos de baixo peso molecular, tais como os ácidos glicólico e láctico, aumenta a medida que as condições reacionais do pré-tratamento com hidróxido de cálcio se tornam mais severas, ou seja, alta concentração do reagente ou altas temperaturas (SJÖSTRÖM, 1991).

Em relação ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a principal função do oxigênio ativo, obtido através de reações do peróxido em meio alcalino, é a remoção da lignina através da geração de compostos oxigenados.

Em meio alcalino fraco, o peróxido age de forma seletiva nos compostos fenólicos, promovendo uma cisão parcial da lignina, causando a sua degradação sem alterar a fração celulósica dos materiais lignocelulósicos (CURRELI *et al.*, 1997). Usando apenas peróxido em meio alcalino (PATEL e BHATT, 1991) ou combinando-o com uma etapa anterior de pré-tratamento alcalino (CURRELI *et al.*, 1997), a eficácia quanto ao processo de deslignificação é notório.

Comparado o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a outros processos, este apresenta como vantagem a redução da cristalinidade da celulose e decomposição da lignina em gás carbônico, água e ácido carboxílico. Além disso, substâncias inibidoras como furfural e 5-hidroximetilfurfural não são produzidas, ao contrário da maioria dos outros métodos de pré-tratamento (CHENG, 2001).

4.2. Materiais

4.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, foram utilizados os reagentes químicos listado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido acético	Chemco	99,7
Ácido clorídrico	Merck	37
Hidróxido de cálcio	Merck	≥ 96
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95
Peróxido de hidrogênio	Ecibra	30

Além dos reagentes, as enzimas, previamente analisadas como apresentado nas seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, e os padrões cromatográficos, apresentados na Tabela 3.1, também foram

utilizados.

4.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;
- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo MA-832 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS TecnoPON, com precisão de 0,01;
- Peneiras circulares
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

4.3. Procedimento Experimental

4.3.1. Planejamento Experimental dos Pré-Tratamentos

Visando melhorar a etapa de hidrólise enzimática para a obtenção dos açúcares fermentescíveis, planejamentos experimentais foram realizados para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, através do estudo de algumas variáveis do processo e suas interações, objetivando a liberação máxima de glicose.

Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o estudo do efeito deste reagente nos diferentes tamanhos de partícula foi realizado anteriormente (RABELO, 2007). Neste estudo anterior, o intuito foi otimizar a etapa de pré-tratamento do bagaço de cana utilizando como agente o peróxido de hidrogênio alcalino. Como esta tese de doutorado trata-se de uma continuação deste trabalho, visando um maior aprofundamento do estudo e propondo uma comparação entre dois processos de pré-tratamento (hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino), alguns pontos relevantes deste trabalho anterior serão descritos e apresentados com o intuito de facilitar a compreensão e comparação dos resultados. Sendo assim, maiores informações e detalhamentos deverão ser obtidos em RABELO (2007).

Assim, para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, iniciaram-se os estudos através de um planejamento fatorial linear, com análise de 3 variáveis do processo: tempo reacional (h), temperatura (°C) e concentração do reagente (Ca(OH)_2 (g/g biomassa seca)).

4.3.1.1.Reações do Pré-Tratamento

Amostras de aproximadamente 4,0 g de bagaço não peneirado e peneirado foram tratadas com 100 mL da solução contendo hidróxido de cálcio a uma concentração pré-determinada pelo planejamento. As amostras foram incubadas e mantidas a uma rotação de 150 rpm com temperaturas e tempos reacionais pré-determinados pelo planejamento experimental.

Ao término do pré-tratamento com Ca(OH)_2 , o material resultante (líquido reacional + biomassa) teve o pH ajustado utilizando uma solução de ácido clorídrico 5,0 mol/L previamente padronizada. A quantidade de cal consumida durante o pré-tratamento, em cada uma das condições estudadas, foi determinada através do pH de neutralização. A metodologia para essa análise foi descrita no *apêndice X*.

Este procedimento é normalmente muito lento, sendo necessária a verificação do pH por um período mínimo de 4 dias. Os sais obtidos na neutralização da biomassa não afetam as análises posteriores, já que, após a neutralização, a biomassa foi lavada. O principal objetivo deste procedimento foi neutralizar a amostra e deixá-la pronta para os procedimentos analíticos e

hidrólise enzimática. Esta etapa é muito importante, uma vez que os íons Ca^+ recobrem o material, proporcionando um aumento da massa, levando assim a erros de quantificação. Além disso, a presença dos íons pode ocasionar problemas no ajuste do pH para a etapa de hidrólise enzimática.

Após a neutralização e lavagem do material, este foi seco em estufa a temperatura de 105°C , pesado e armazenado em pote plástico para utilização posterior na hidrólise enzimática.

Segundo GOULD (1985), a secagem da biomassa a 105°C , após o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino, não influencia muito no processo de absorção de água pela biomassa durante a etapa de hidrólise, se comparada com uma biomassa seca à temperatura ambiente. Ou seja, a alta temperatura não modifica as estruturas do resíduo pré-tratado, o que poderia ocasionar a dificuldade de absorção de água pelo mesmo.

Além disso, estudos realizados por HOUGHTON *et al.* (2009) mostraram a não interferência da temperatura de secagem na análise da composição química da palha de trigo e milho. Visando determinar estatisticamente a temperatura correta de secagem sem afetar negativamente a qualidade desta análise, os autores mostraram, com confiança de 95%, que não há diferença significativa na liberação dos açúcares quando a biomassa foi seca a temperaturas de até 100°C .

Logo, a secagem da biomassa foi efetuada a 105°C , sem que houvesse ocorrência de eventuais problemas na etapa hidrólise e análise da composição química.

4.3.2. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado

A eficácia de um pré-tratamento é relatada, frequentemente, em termos de rendimento glicosídico, e não apenas em termos da composição química e das características físicas da biomassa após o pré-tratamento.

Assim, para verificação das melhores condições de pré-tratamento e tamanho de partícula, hidrólises foram realizadas para cada uma das amostras, nas condições ótimas de

temperatura e pH da enzima, com a finalidade de quantificar os açúcares liberados durante esta etapa.

Após a secagem do resíduo resultante do pré-tratamento do bagaço não peneirado e peneirado, a hidrólise enzimática foi realizada, para cada um dos ensaios, utilizando uma concentração de 1% (m/v) de sólidos. O pH das amostras foi ajustado para 4,8 (pH ótimo) e os erlenmeyers foram fechados e encubados em um shaker a 100 rpm. A temperatura utilizada durante a hidrólise foi de 50°C, anteriormente determinada como ótima para a enzima.

Para investigar as condições de pré-tratamento e verificar quais variáveis do processo influenciam a etapa de pré-tratamento, amostras do líquido reacional de hidrólise (aproximadamente 2 mL) foram coletadas em períodos de tempo pré-determinado, isto é, 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, e, então, fervidas por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas.

Visando apenas a avaliação dos pré-tratamentos e não uma máxima produção de glicose, optou-se por trabalhar nesta etapa de hidrólise com uma baixa carga enzimática, sendo de 3,50 FPU/g de biomassa seca para a enzima celulase e 1,00 CBU/g de biomassa seca para a enzima β -glicosidase.

Ao final das 72 h de hidrólise e coleta do líquido reacional neste tempo, os resíduos restantes foram transferidos para uma peneira de 150 mesh e lavados em água corrente para remoção do açúcar residual (aproximadamente 200 mL água). As amostras foram secas a 105°C, pesadas e armazenadas.

4.3.2.1. Quantificação dos Carboidratos no Hidrolisado

Os carboidratos liberados após a hidrólise enzimática foram quantificados por CLAE, como descrito no procedimento padrão do *apêndice V, itens 6 e 7*. Após a quantificação dos açúcares, traçou-se o perfil da hidrólise em cada ensaio, onde a concentração dos açúcares liberados no meio reacional foi analisada em função do tempo de hidrólise.

4.3.3. Análise dos Resultados de Pré-Tratamento e Hidrólise Enzimática

Após a análise dos perfis de hidrólise para cada ensaio, foram determinados os pontos de estabilização para cada reação, ou seja, pontos onde as concentrações dos carboidratos liberados no meio reacional permaneceram praticamente inalteradas em relação ao tempo.

Estes valores foram então utilizados para análise, juntamente com os dados do planejamento experimental fatorial dos pré-tratamentos, visando a maximização da liberação de glicose para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Nesta etapa foi utilizando o programa computacional STATISTICA 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

4.3.3.1. Cálculo de Rendimentos do Pré-tratamento, Hidrólise e Global

Os rendimentos da etapa de pré-tratamento, hidrólise e global foram calculados baseados na definição apresentada na Figura 4.1, utilizando o conceito e equações descritas no *apêndice XI*.

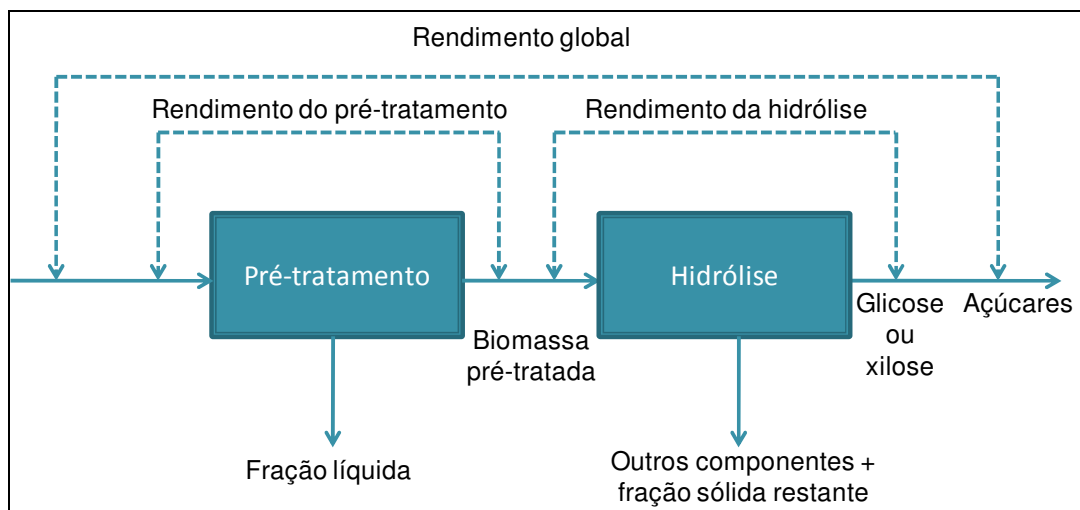


Figura 4.1: Diagrama esquemático para o cálculo dos rendimentos de pré-tratamento, hidrólise e global.

O rendimento de cada etapa foi calculado após a determinação da composição química do material, antes e após a etapa de pré-tratamento (rendimento do pré-tratamento), e a quantificação dos açúcares presentes no meio reacional após a hidrólise enzimática (rendimento da hidrólise). As metodologias para essas análises foram descritas no *apêndice IV* e *V*.

Para o rendimento da etapa de hidrólise da celulose, optou-se por considerar apenas o açúcar fermentescível glicose como produto, excluindo assim deste cálculo a celobiose. No cálculo do rendimento global foi levado em consideração o efeito combinado das duas etapas, pré-tratamento e hidrólise.

Para avaliar a etapa de pré-tratamento optou-se também pela execução da etapa de hidrólise, acreditando que não apenas a composição química do material é importante para a liberação dos açúcares fermentescíveis, mas também efeitos como a cristalinidade, porosidade, área superficial, etc. Assim, o rendimento global foi utilizado para avaliar a etapa de pré-tratamento.

4.4. Resultados e Discussões

4.4.1. Planejamento Fatorial 2^3 do Pré-Tratamento com Hidróxido de Cálcio

Para o hidróxido de cálcio, iniciou-se um planejamento fatorial linear com três repetições no ponto central, onde foram estudadas 3 variáveis do processo: tempo reacional, temperatura e concentração de Ca(OH)_2 . Os valores decodificados e codificados dos níveis para cada uma das variáveis foram baseados em dados da literatura e encontram-se dispostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Matriz de planejamento 2^3 com três pontos centrais para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Ensaio	Substrato	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração de Cal (g/g biomassa seca)
1	BNP e BP	20 (-1)	60 (-1)	0,25 (-1)
2	BNP e BP	54 (+1)	60 (-1)	0,25 (-1)
3	BNP e BP	20 (-1)	80 (+1)	0,25 (-1)
4	BNP e BP	54 (+1)	80 (+1)	0,25 (-1)
5	BNP e BP	20 (-1)	60 (-1)	0,55 (+1)
6	BNP e BP	54 (+1)	60 (-1)	0,55 (+1)
7	BNP e BP	20 (-1)	80 (+1)	0,55 (+1)
8	BNP e BP	54 (+1)	80 (+1)	0,55 (+1)
9	BNP e BP	37 (0)	70 (0)	0,40 (0)
10	BNP e BP	37 (0)	70 (0)	0,40 (0)
11	BNP e BP	37 (0)	70 (0)	0,40 (0)

4.4.1.1. Neutralização da Cal

Durante a etapa de pré-tratamento, a cal foi adicionada segundo quantidades estabelecidas pelo planejamento estatístico, como mostra a Tabela 4.2.

A Figura 4.2 mostra a porcentagem de cal consumida após a etapa de pré-tratamento, quantificada através da determinação da massa de cal restante no meio reacional segundo a metodologia descrita no *apêndice X*.

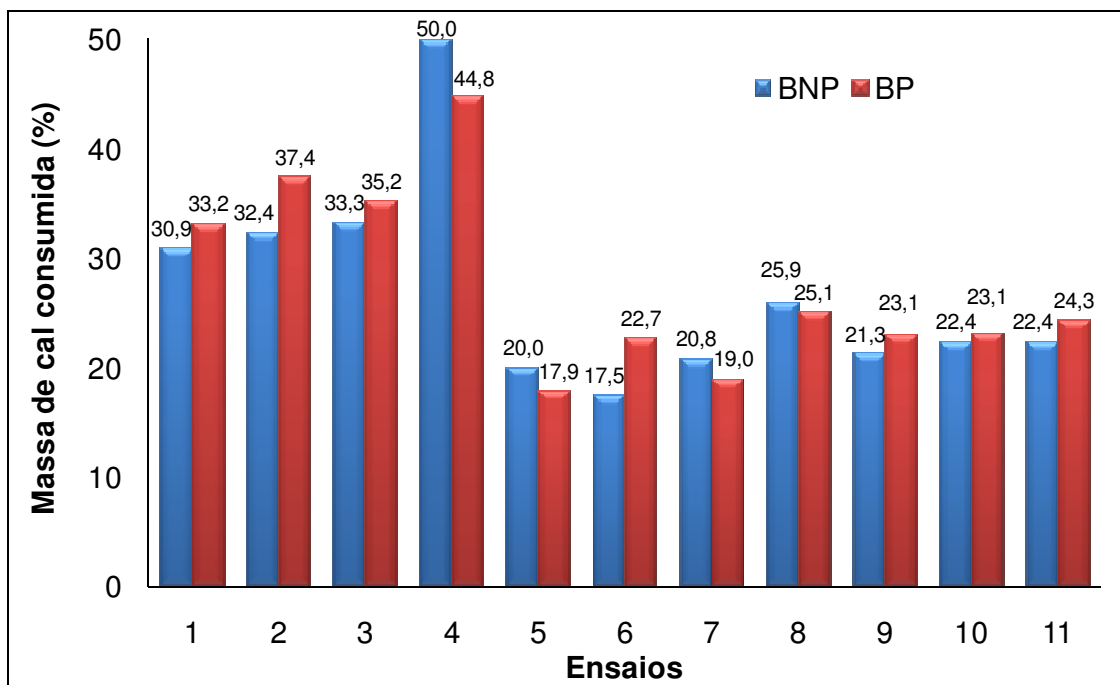


Figura 4.2: Porcentagem da massa de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP).

Analisando a Figura 4.2 observa-se que, para os ensaios de 1 a 4, onde uma menor concentração da cal foi adicionada, a maior porcentagem de cal consumida foi observada para o ensaio 4, trabalhando com altos tempos e temperaturas, sendo que 50,0% da cal inicial adicionada foi consumida para o bagaço não peneirado e 44,8% para o bagaço peneirado.

Os ensaios de 5 a 8, onde maiores concentrações de cal foram adicionadas, observa-se que a menor porcentagem consumida ocorreu no ensaio 6, para o bagaço não peneirado, sendo o pré-tratamento realizado na menor temperatura estudada e maior tempo. Para o bagaço peneirado, a menor porcentagem de cal consumida foi observada no ensaio 5, trabalhando com menor tempo de reação e temperatura. A porcentagem consumida foi de 17,5% para o bagaço não peneirado e 17,9% para o bagaço peneirado.

Segundo RAMIREZ (2005), o consumo da cal em reações de pré-tratamento está diretamente relacionado com um grau de deslignificação da biomassa.

4.4.1.1.1. Análise Estatística da Porcentagem de Cal Consumida

Para verificar a relação entre a porcentagem de cal consumida durante a etapa de pré-tratamento e as demais variáveis do processo (tempo, temperatura, concentração de cal), foram realizadas análises estatísticas utilizando o software STATISTICA 7.0. A Figura 4.2 apresenta os valores da porcentagem de cal consumida após cada um dos pré-tratamentos utilizando o bagaço não peneirado e peneirado.

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando o erro puro. Para dizer se a variável é significativa ou não, foram utilizados os parâmetros estatísticos t e p. O nível de confiança para essas análises foi de 95,0%, o que corresponde a um valor de $p < 0,05$. O valor de t mostra o quão grande é o valor do efeito em relação ao seu desvio padrão.

• Análise Estatística da Porcentagem de Cal Consumida para o Bagaço Não Peneirado

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para a porcentagem de cal consumida após cada um dos ensaios, utilizando o bagaço não peneirado, pode ser vista na Tabela 4.3.

Analizando a Tabela 4.3 podemos perceber que apenas o efeito das interações temperatura/concentração de cal ($2*3$) e tempo/temperatura/concentração de cal ($1*2*3$) não se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Logo, estes efeitos e interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 4.4.

Para que um modelo seja considerado estatisticamente significativo e possa ser utilizado para fins preditivos, o valor de F calculado para verificar a significância da regressão deve ser maior do que o tabelado. Em contrapartida, o teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor menor que o valor tabelado. Se essas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado bom.

Tabela 4.3: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	27,3	0,378	72,9	*0,0002
Tempo (h)	2,59	0,444	5,83	*0,0282
Temperatura (°C)	3,66	0,444	8,25	*0,0144
Conc. de cal (g/g)	-7,79	0,444	-17,6	*0,0032
1*2	2,86	0,444	6,42	*0,0234
1*3	-1,95	0,444	-4,41	*0,0479
2*3	-1,34	0,444	-3,03	0,0939
1*2*3	-0,952	0,444	-2,15	0,165

* Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Tabela 4.4: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço não peneirado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	741,75	5	148,35	8,03 ¹
Resíduos (r)	92,37	5	18,47	18,91 ²
Falta de ajuste (faj)	89,23	3	29,74	
Erro puro (ep)	3,15	2	1,57	
Total (T)	834,12	10		
% de variação explicada (R^2)	88,93			
% máxima de variação explicável	99,62			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{5,5} = 5,05$ no nível de 95% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{3,2} = 19,16$ no nível de 95% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da Tabela 4.4 observa-se que o valor do teste F calculado de 8,03 é superior ao tabelado ($F(\text{tab.})_{5,5} = 5,05$). O modelo não apresenta evidência de falta de ajuste pois o valor de F calculado é 18,91, menor que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{3,2} = 19,16$). Assim, o modelo obtido é estatisticamente significativo para a porcentagem de cal consumida.

A porcentagem de cal consumida durante o pré-tratamento do bagaço não peneirado pode ser descrita pela Equação 4.1. Os valores de tempo (t), temperatura (T) e concentração de cal (C) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$\% \text{Ca(OH)}_2 \text{ consumida}_{BNP} = 27,33 + 2,585t + 3,659T - 7,793C + 2,856tT - 1,953tC \quad 4.1$$

As superfícies de resposta, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas na Figura 4.3.

Pode-se observar analisando a Figura 4.3 que a maior porcentagem de cal consumida se dá quando se trabalha com altos tempos e temperaturas.

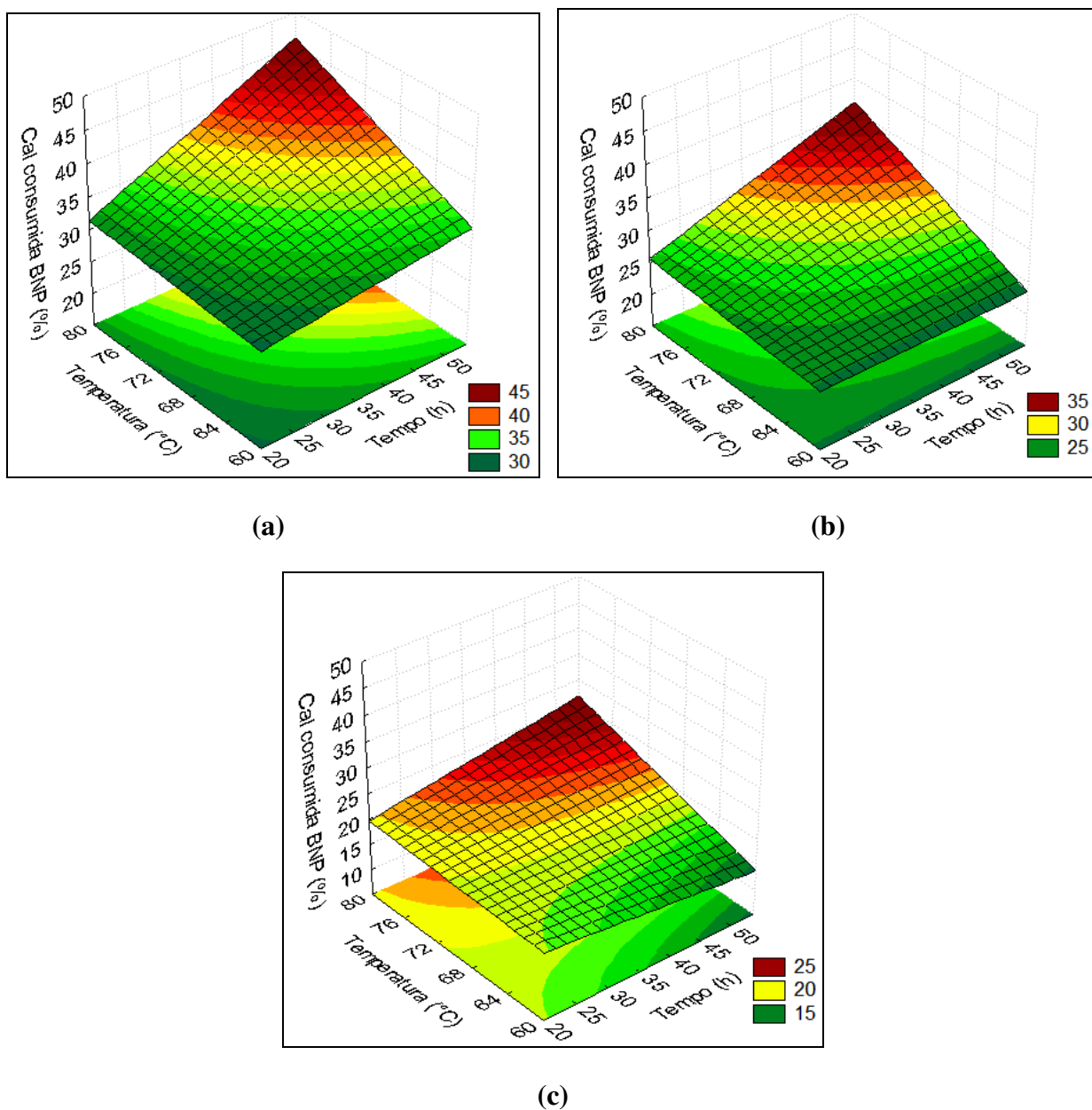


Figura 4.3: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida para o BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

• Análise Estatística da Porcentagem de Cal Consumida para o Bagaço Peneirado

A Tabela 4.5 apresenta a análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para a porcentagem de cal consumida após cada um dos ensaios, utilizando o bagaço peneirado.

Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço peneirado.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	27,7	0,307	90,0	*0,0001
Tempo (h)	3,17	0,360	8,80	*0,0127
Temperatura (°C)	1,55	0,360	4,31	*0,0500
Conc. de cal (g/g)	-8,32	0,360	-23,1	*0,0019
1*2	0,895	0,360	2,49	0,131
1*3	-0,297	0,360	-0,825	0,496
2*3	-0,807	0,360	-2,24	0,154
1*2*3	-0,444	0,360	-1,23	0,343

* Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Pode-se observar analisando a Tabela 4.5 que apenas os efeitos principais são estatisticamente significativos a 95% de confiança. Todos os efeitos de interação das variáveis não apresentaram significância sendo assim eliminados do modelo e considerados como erros aleatórios experimentais.

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 4.6

Tabela 4.6: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço peneirado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	652,84	3	217,61	15,04 ¹
Resíduos (r)	101,29	7	14,47	19,14 ²
Falta de ajuste (faj)	99,22	5	19,84	
Erro puro (ep)	2,07	2	1,04	
Total (T)	754,13	10		
% de variação explicada (R ²)	86,57			
% máxima de variação explicável	99,73			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*F(tab.)_{3,7} = 4,34 no nível de 95% para a regressão

*F(tab.)_{5,2} = 19,30 no nível de 95% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da Tabela 4.6 observa-se que o valor do teste F calculado de 15,04 é superior ao tabelado (F(tab.)_{3,7} = 4,34). O modelo não apresenta evidência de falta de ajuste, pois o valor de F calculado é 19,14, menor que o valor tabelado (F(tab.)_{5,2} = 19,30). Assim, o modelo obtido é estatisticamente significativo para a porcentagem de cal consumida no pré-tratamento do bagaço peneirado.

A porcentagem de cal consumida pelo bagaço peneirado durante o pré-tratamento pode ser descrita através da Equação codificada 4.2.

$$\% \text{ Ca(OH)}_2 \text{ consumida}_{BP} = 27,65 + 3,168t + 1,550T - 8,317C \quad 4.2$$

A Figura 4.4 apresenta as superfícies de resposta, considerando apenas os efeitos significativos, da porcentagem de cal consumida após o pré-tratamento do bagaço peneirado.

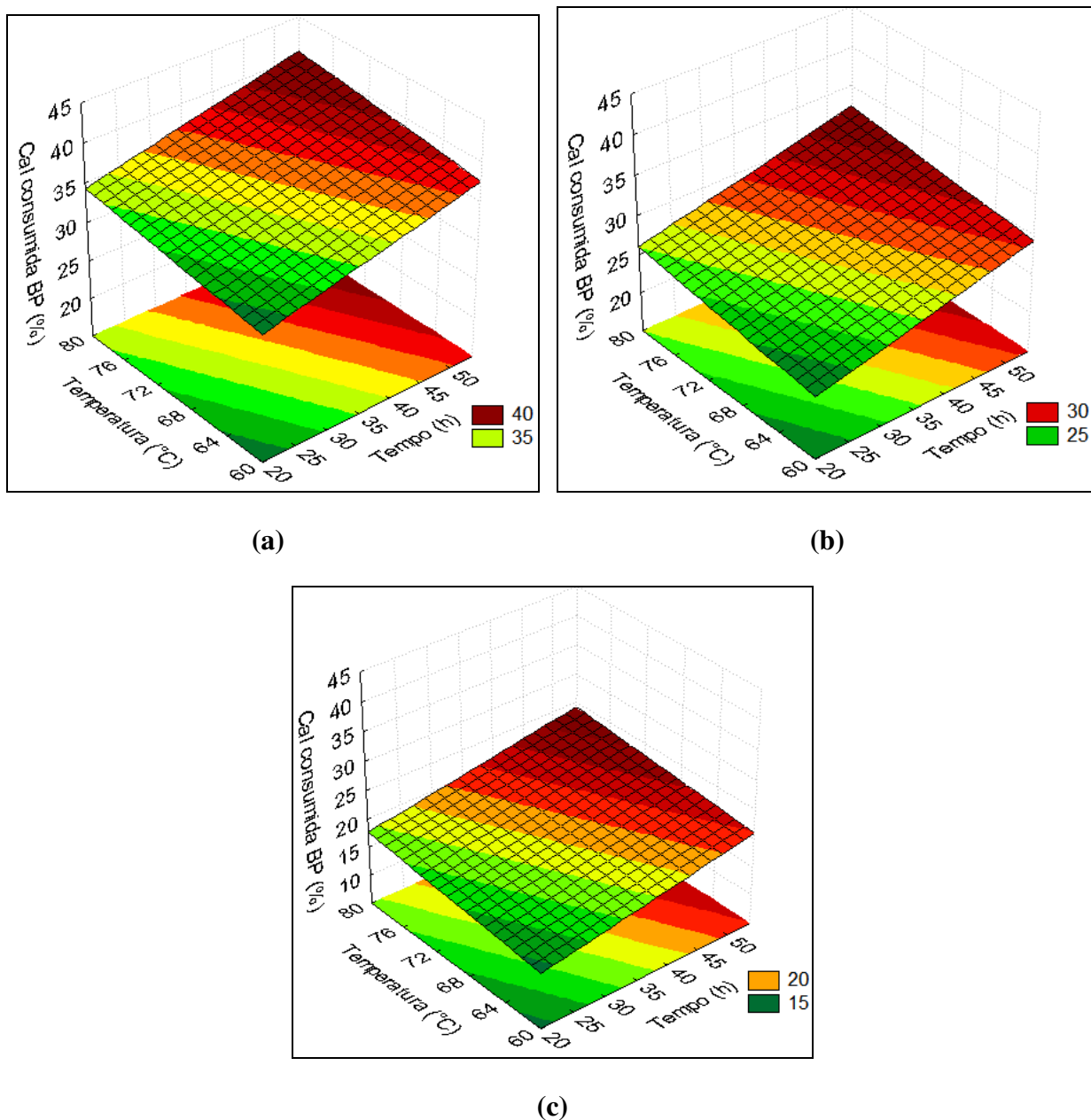


Figura 4.4: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida para o BP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

Analizando a Figura 4.4 observa-se que a maior porcentagem de cal consumida ocorre quando se trabalha com maiores tempos e temperaturas, sendo o mesmo aspecto observado do bagaço não peneirado (Figura 4.3). Observa-se também que a variável tempo apresenta uma maior influência se comparada com a temperatura, já que se observam maiores porcentagens de cal consumida trabalhando em uma ampla faixa de temperatura desde que se trabalhe com tempos longos.

4.4.1.2. Hidrólise e Quantificação dos Açúcares para o Bagaço Pré-Tratado com Ca(OH)_2

Após o pré-tratamento, segundo as condições descritas na Tabela 4.2, o material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática para liberação e quantificação dos açúcares. As condições reacionais e metodologia da hidrólise estão descritas na *seção 4.3.2.1*.

A Figura 4.5 mostra a porcentagem de massa solubilizada após o pré-tratamento de 4,0 g de bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP), e após a hidrólise enzimática de 1,0 g de bagaço pré-tratado em cada uma das condições operacionais determinadas pelo planejamento estatístico.

Analizando a Figura 4.5, nota-se que houve uma solubilização de 24 a 37% da biomassa na etapa de pré-tratamento e que 41 a 62% da biomassa foi hidrolisada. Observa-se, em todos os casos, uma perda de massa e hidrólise mais acentuada para o bagaço peneirado. Isso se deve ao fato deste material apresentar uma maior área superficial, possibilitando maior interação biomassa-reagente.

A baixa perda de massa na etapa de pré-tratamento pode ser explicada pelo fato do pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresentar um menor efeito na remoção da hemicelulose se comparado com outros pré-tratamentos (MOSIER *et al.*, 2005). O pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresenta um alto efeito na acessibilidade da área superficial do substrato, além de alterar a estrutura e remover a lignina.

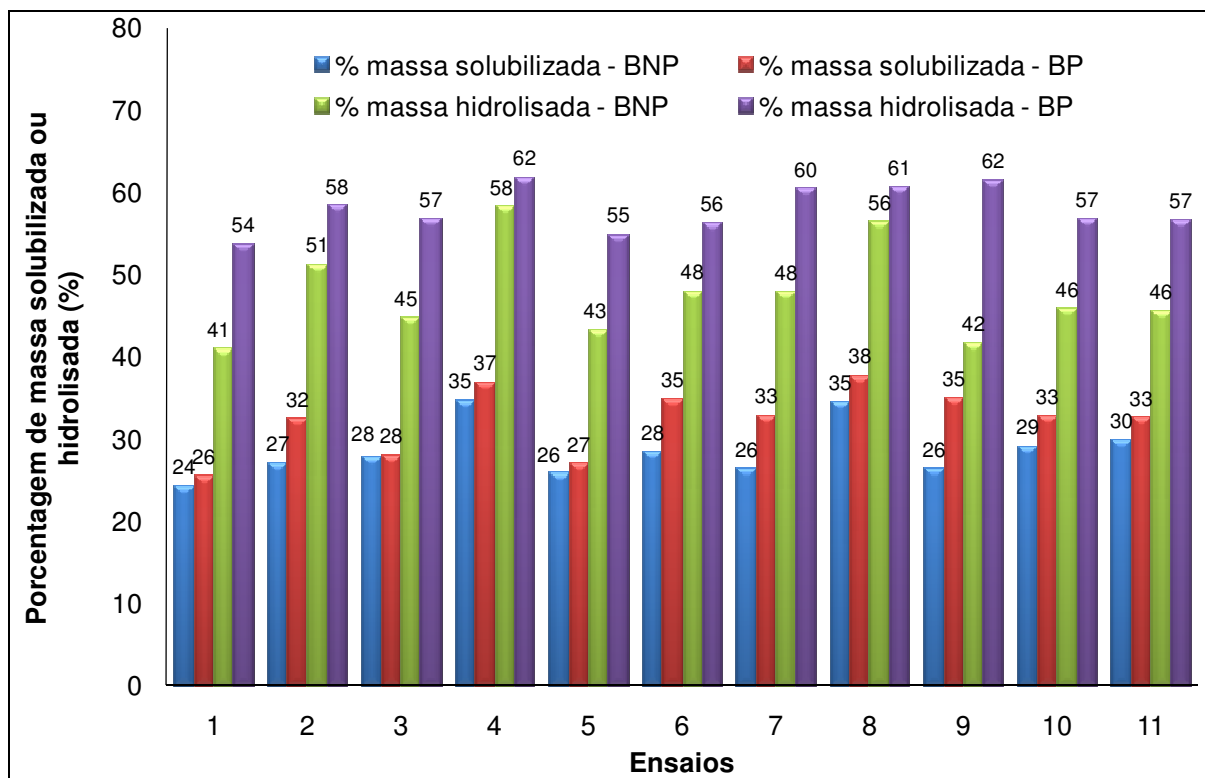
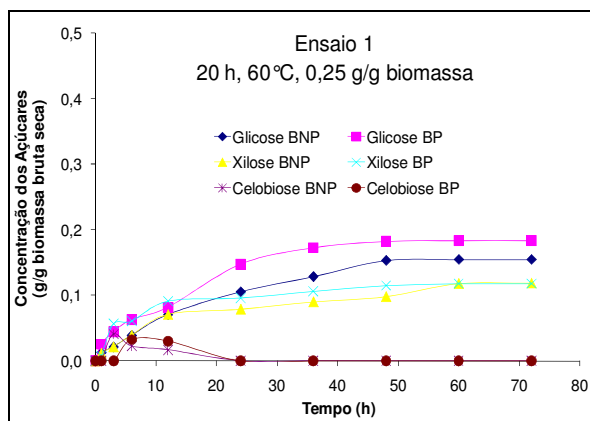


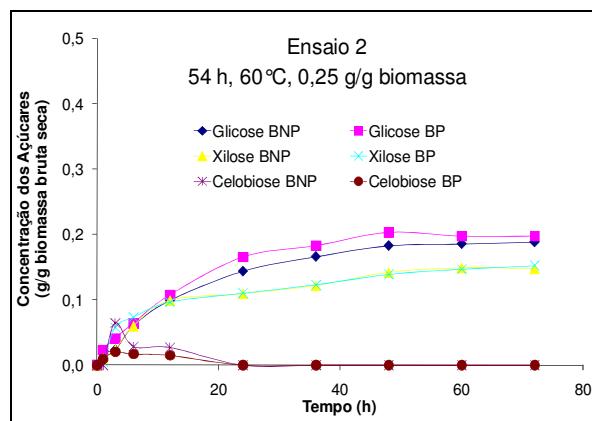
Figura 4.5: Massa de bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP), solubilizada após o pré-tratamento de 4,0 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1,0 g de bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Ainda na Figura 4.5 observa-se que as maiores perdas de massa durante a etapa de pré-tratamento e maior massa hidrolisada, para os dois bagaços, foram observadas nos ensaios 4 e 8, ambos com altos tempos e temperaturas de pré-tratamento, variando apenas a concentração de cal.

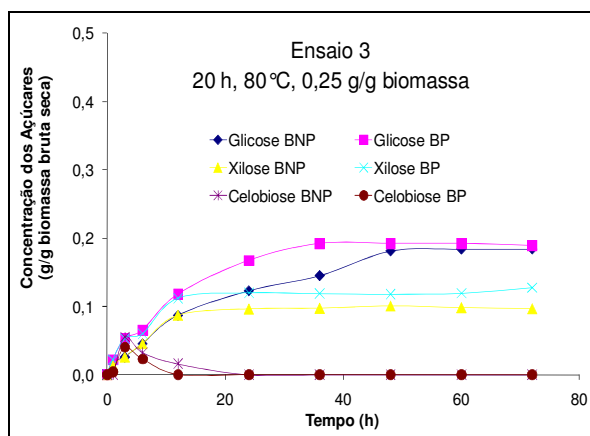
A Figura 4.6 apresenta os perfis de hidrólise para todos os ensaios e para uma amostra de bagaço não peneirado e peneirado sem pré-tratamento, com o intuito de avaliar a real importância desta etapa na liberação dos açúcares fermentescíveis. Em todos os ensaios foram analisadas as concentrações de açúcares (glicose, xilose, arabinose, manose e celobiose) liberadas em função do tempo de hidrólise.



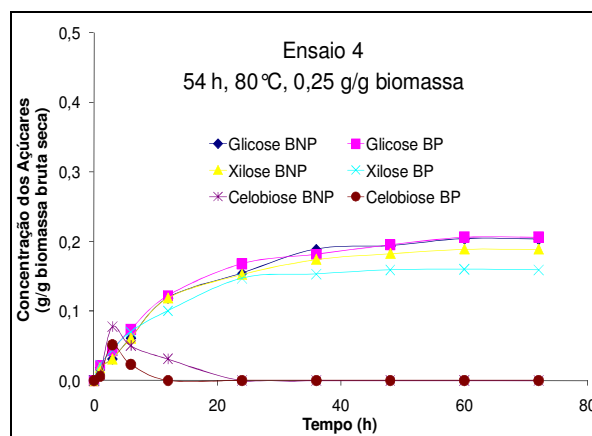
(a)



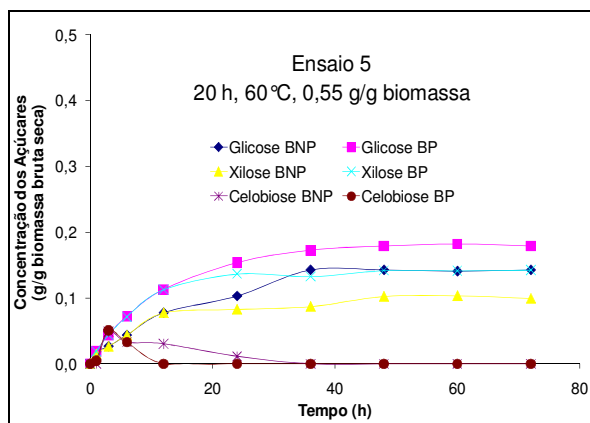
(b)



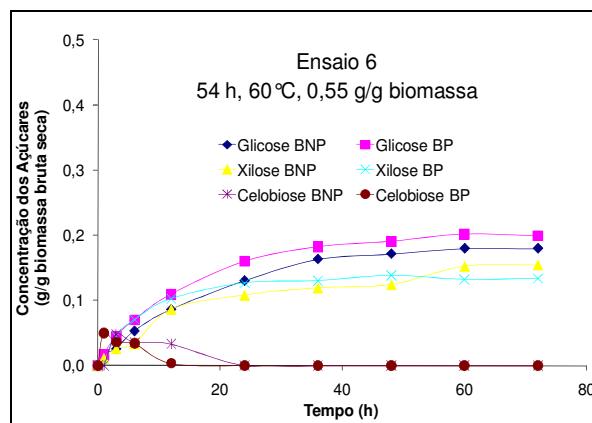
(c)



(d)



(e)



(f)

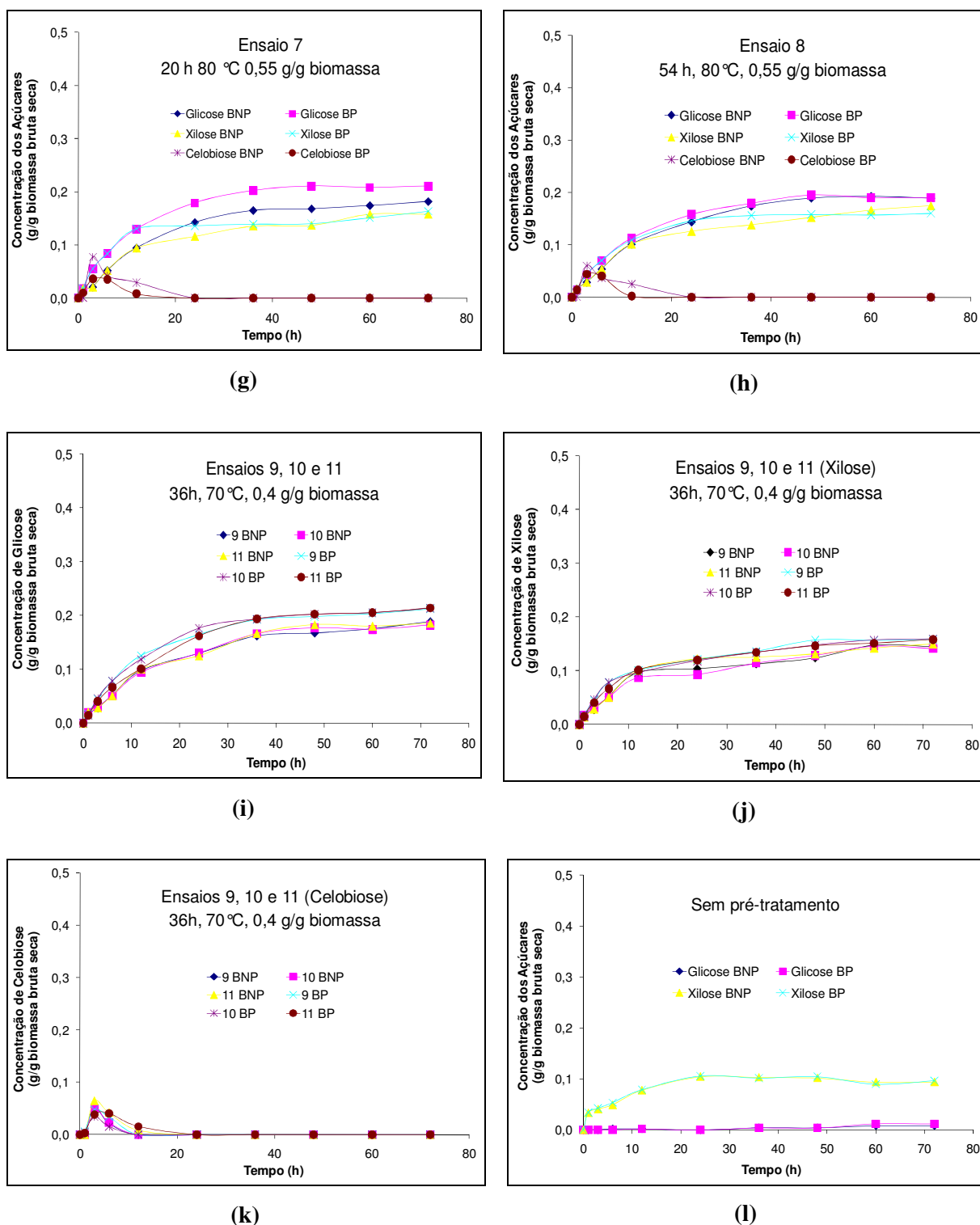


Figura 4.6: Perfis de hidrólise para os ensaios do planejamento estatístico linear para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Ao analisarmos a Figura 4.6 (a-k) observam-se baixas concentrações de glicose e xilose liberadas. Sabe-se que a celulose resulta apenas na liberação de glicose, sendo assim, parte da hemicelulose também foi hidrolisada pelo complexo celulolítico. Comprova-se, mais uma vez, que o pré-tratamento com cal remove pouca hemicelulose, já que há uma considerável concentração de xilose liberada se comparada com a concentração de glicose.

Nota-se que, na maioria dos ensaios, há maiores concentrações de glicose e xilose liberadas para o bagaço peneirado que para o bagaço não peneirado. Ressalta-se que esta diferença entre os rendimentos é mínima, menos de 5% para cada um dos açúcares.

Em relação à celobiose, as Figura 4.6 (a-h, k) mostram um acúmulo deste carboidrato no início da hidrólise, sendo este hidrolisado ao longo do tempo e não havendo, assim, acúmulo no reator.

Na Figura 4.6 (l) observa-se que a quantidade de glicose liberada após hidrólise dos bagaços não peneirado e peneirado sem pré-tratamento é bem baixa, sendo obtidas 0,008 g/g biomassa bruta e 0,012 g/g biomassa bruta, respectivamente, tendo sido apenas 21% da massa do BNP hidrolisada contra 23% para o BP.

Observa-se uma pequena liberação de xilose, indicando que o complexo celulolítico comercial utilizado nos experimentos apresenta enzimas capazes de hidrolisar as cadeias de hemicelulose. Estando essas cadeias mais expostas ao ataque enzimático, em comparação com as cadeias de celulose, a hemicelulose é praticamente a única fração hidrolisada no bagaço sem pré-tratamento.

Segundo estudos realizados por JUHÁSZ *et al.* (2005), a enzima comercial Celluclast apresenta atividade de xilanase, mananase e β -glicosidade menor que as enzimas não comerciais. Em contrapartida, a atividade da acetil xilana esterase é alta se comparada com enzimas não-comerciais. Assim, o complexo é passível de hidrolisar hemiceluloses, principalmente polímeros de arabino-xilanas do bagaço.

4.4.1.2.1. Determinação dos Efeitos Principais e de Interação das Variáveis

Após a análise dos perfis de hidrólise para cada um dos ensaios, as concentrações dos açúcares liberadas no meio reacional foram utilizadas como resposta para a análise estatística. Para isso, foi utilizado o valor onde a concentração dos açúcares liberados no meio reacional permaneceu praticamente constante.

Vale ressaltar que esses pontos de término da reação ocorreram em tempos diferentes para cada um dos ensaios, ficando o máximo de rendimento em um intervalo entre 36 e 60 h de hidrólise.

A Tabela 4.7 mostra a concentração dos açúcares liberados em cada combinação de níveis, sendo os ensaios 9, 10 e 11 repetições no ponto central. São marcados em negrito os melhores resultados obtidos. Os resultados foram expressos em grama de açúcar por grama de biomassa bruta seca (rendimento global).

Os valores relacionados à celobiose não foram apresentados na Tabela 4.7, visto que não houve acúmulo do carboidrato no meio reacional. Sabe-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consegue metabolizar facilmente as hexoses (glicose), mas não tem capacidade de metabolizar as pentoses (xilose e arabinose) presentes nos hidrolisados lignocelulósicos. Como o objetivo principal é a produção de etanol a partir da fermentação dos açúcares utilizando para isso a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a análise estatística foi realizada apenas para a glicose, visto que esse é o único açúcar fermentescível quantificado nessas análises iniciais.

Tabela 4.7: Matriz de planejamento com os resultados da concentração dos açúcares liberados em cada um dos ensaios do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração de cal (g/g)	Glicose BNP (g/g)	Glicose BP (g/g)	Xilose BNP (g/g)	Xilose BP (g/g)
1	20	60	0,25	0,155	0,183	0,118	0,118
2	54	60	0,25	0,186	0,203	0,149	0,139
3	20	80	0,25	0,182	0,192	0,100	0,118
4	54	80	0,25	0,202	0,206	0,189	0,160
5	20	60	0,55	0,143	0,179	0,103	0,142
6	54	60	0,55	0,179	0,202	0,152	0,132
7	20	80	0,55	0,174	0,211	0,158	0,140
8	54	80	0,55	0,193	0,196	0,166	0,158
9	37	70	0,40	0,189	0,199	0,145	0,157
10	37	70	0,40	0,183	0,206	0,141	0,147
11	37	70	0,40	0,186	0,203	0,150	0,146

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando o erro puro através do software STATISTICA 7.0. O nível de confiança para essas análises foi de 90,0%, valor determinado em trabalhos anteriores como adequado.

4.4.1.2.1.1. Análise da Concentração de Glicose – Bagaço Não Peneirado

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado pode ser vista na Tabela 4.8.

Analizando a Tabela 4.8 podemos perceber que apenas as interações tempo/concentração de cal (1*3), temperatura/concentração de cal (2*3) e tempo/temperatura/concentração de cal (1*2*3) apresentam valores de p maiores que 0,1, sendo assim, não são considerados estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Nota-se que o efeito do tempo apresenta o maior coeficiente de regressão, seguido pelo efeito da temperatura. O menor efeito principal é o da concentração de cal, sendo este negativo. A princípio, sugere-se que aumentando o tempo e a temperatura durante a etapa de pré-tratamento e

diminuindo a concentração de cal, consegue-se obter maiores rendimentos de glicose após a etapa de hidrólise enzimática. Isso é confirmado pelo ensaio 4 da Tabela 4.7, onde se trabalha com as condições de maiores tempos e temperatura e menor concentração de cal e obtém-se a maior liberação de glicose.

Tabela 4.8: Coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,179	0,0011	156,2	*0,00004
Tempo (h)	0,0133	0,0011	11,7	*0,00720
Temperatura (°C)	0,0109	0,0011	9,64	*0,0106
Conc. de cal (g/g)	-0,0045	0,0011	-3,94	*0,0587
1*2	-0,0035	0,0011	-3,10	*0,0900
1*3	0,0005	0,0011	0,453	0,695
2*3	0,0001	0,0011	0,0994	0,930
1*2*3	-0,0010	0,0011	-0,851	0,485

* Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

Observa-se ainda que a segunda maior liberação de glicose é obtida para o ensaio 8 (Tabela 4.7), no qual as condições são maiores tempos, temperatura e concentração de cal. Nota-se então que a concentração de cal apresenta uma baixa influência, se comparada com as outras variáveis, em relação ao rendimento da glicose. Observa-se também, analisando a Tabela 4.8, que nenhuma das interações das variáveis estudadas com a concentração de cal são estatisticamente significativas a 90% de confiança, mostrando mais uma vez a sua baixa influência na eficiência da etapa de pré-tratamento.

Para determinar se o modelo é estatisticamente significativo é necessário realizar uma análise da variância (ANOVA), como mostra a Tabela 4.9.

Analisando a Tabela 4.9 pode-se perceber que o valor do teste F calculado foi maior que o valor tabelado ($F(\text{cal.})_{4,6} = 18,53$ e $F(\text{tab.})_{4,6} = 3,18$), concluindo-se que a equação do modelo linear que descreve a concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço não

peneirado é significativa a 90% de confiança. O modelo estudado não apresentou evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 4,67, que é menor que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{4,2} = 9,24$).

Tabela 4.9: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose do bagaço não peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	0,00261	4	0,000654	18,53
Resíduos (r)	0,000212	6	0,000035	4,67
Falta de ajuste (faj)	0,000191	4	0,000048	
Erro puro (ep)	0,000020	2	0,000010	
Total (T)	0,00283	10		
% de variação explicada (R^2)	92,51			
% máxima de variação explicável	99,28			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{4,6} = 3,18$ no nível de 90% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{4,2} = 9,24$ no nível de 90% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

Assim o modelo que descreve a concentração de glicose liberada durante a hidrólise do bagaço não peneirado é estatisticamente significativo, pois atende aos requisitos dos testes F, e pode ser utilizado para fins preditivos. Vale ressaltar que apesar do modelo linear descrever os resultados, a análise estatística mostrou que um modelo quadrático descreveria melhor os resultados, após efetuar o teste de curvatura do modelo. Assim, um modelo quadrático deverá ser utilizado para a otimização do pré-tratamento com cal.

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a Equação 4.3, que representa o modelo linear. Os valores de tempo (t), temperatura (T) e concentração de cal (C) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$C_{\text{glicose liberada BNP}} \text{ (g/g biomassa bruta seca)} = 0,1792 + 0,0133t + 0,0109T - 0,0045C - 0,0035tT \quad 4.3$$

As superfícies de resposta podem ser visualizadas nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

• Superfície de Resposta para o Bagaço Não Peneirado – Concentração de Cal

A Figura 4.7 mostra a superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do bagaço não peneirado em função do tempo e da temperatura. Nesta análise variou-se a concentração de cal nos pontos estudados no planejamento.

Ao analisarmos as superfícies de resposta da Figura 4.7 podemos perceber que os maiores rendimentos de glicose são obtidos quando se trabalha com altos tempos e temperatura. Observa-se também que com o aumento da concentração de cal (a-b-c), há uma pequena diminuição da concentração de glicose liberada pela hidrólise enzimática.

Assim, os resultados sugerem que para encontrarmos o ótimo global deveríamos realizar novos experimentos com maiores tempos e temperaturas de pré-tratamento e menores concentrações de cal.

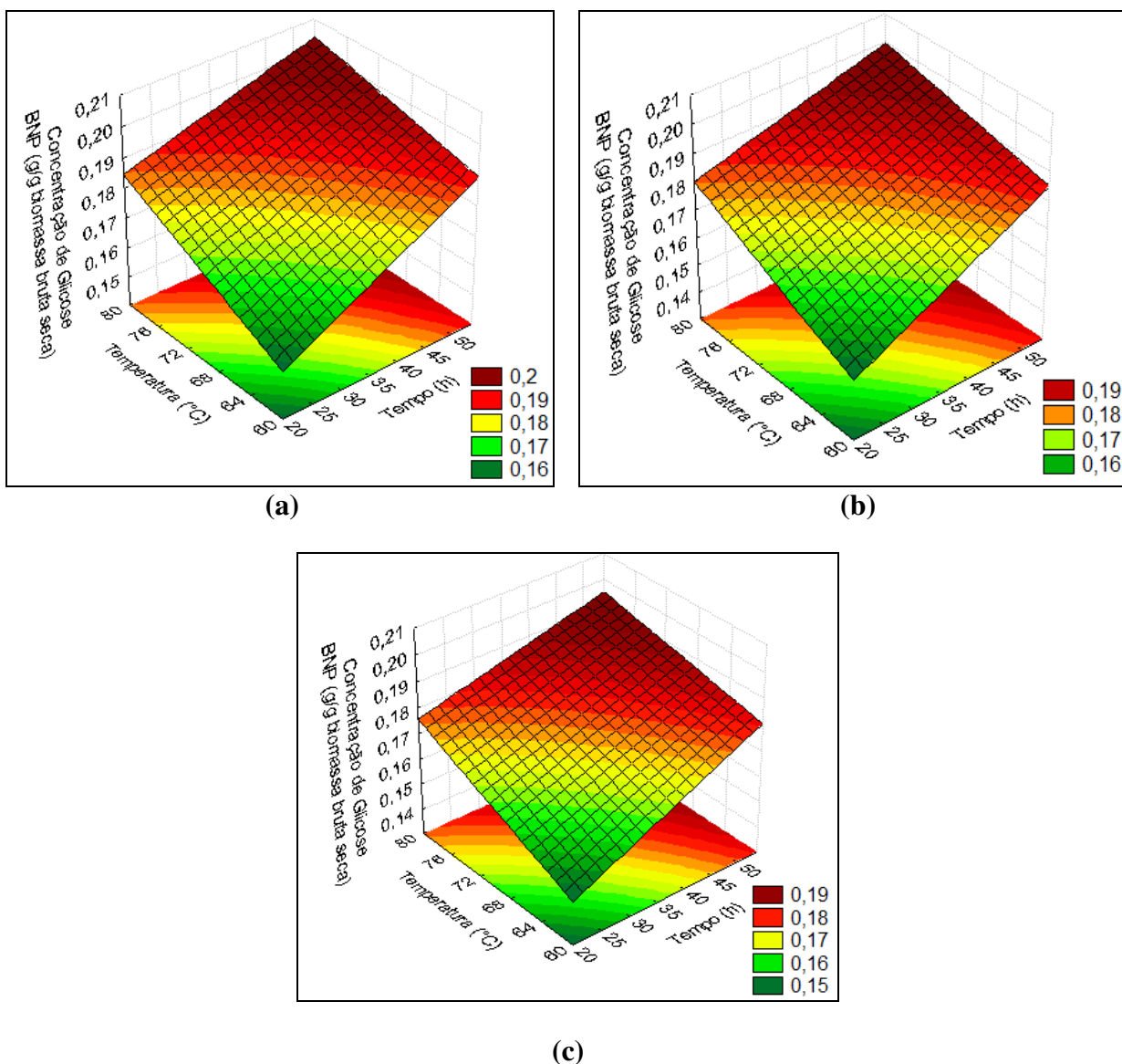


Figura 4.7: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

• Superfície de Resposta para o Bagaço Não Peneirado – Temperatura

Quando a temperatura é variada durante a análise estatística, a superfície de resposta pode ser analisada através da Figura 4.8.

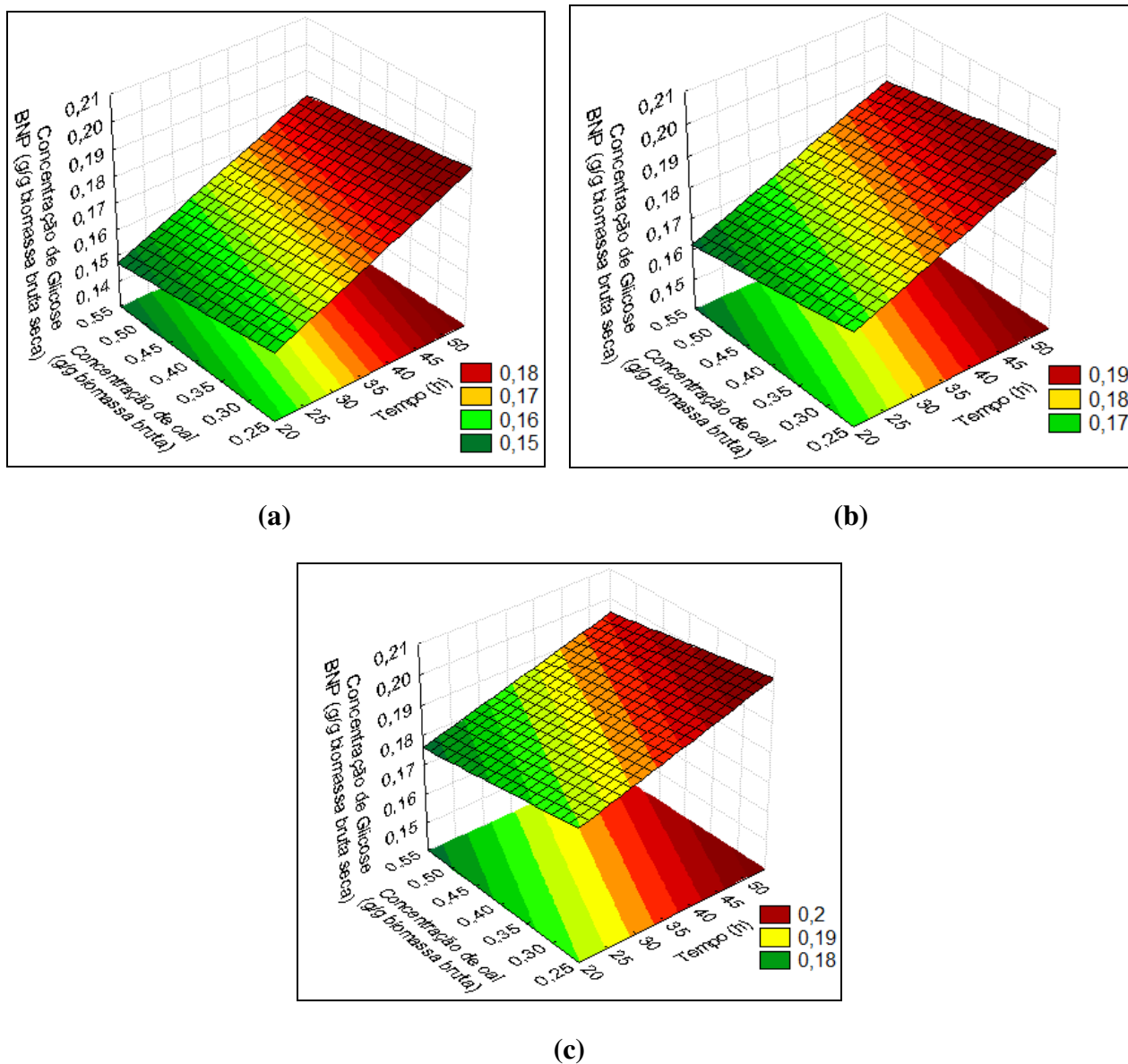


Figura 4.8: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

Na Figura 4.8 observa-se que com o aumento da temperatura (a-b-c), há um aumento da concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço não peneirado pré-tratado. Nota-se que podem ser obtidos altos rendimentos em uma ampla faixa de concentração

de cal quando se trabalha com altos tempos. Isso pode ser observado na Tabela 4.7, onde os dois maiores rendimentos foram obtidos para o ensaio 4 (54 h, 80°C, 0,25 g/g) e para o ensaio 8 (54 h, 80°C, 0,55 g/g). No entanto, os maiores valores são para baixas concentrações de cal.

• Superfície de Resposta para o Bagaço Não Peneirado – Tempo

Quando a variável tempo é analisada através do software STATISTICA, pode-se notar que quanto maior o tempo, maior o rendimento de glicose após a hidrólise enzimática. Estes resultados são apresentados na Figura 4.9.

Na Figura 4.9 observa-se o mesmo comportamento estabelecido na Figura 4.8. Quanto maior o tempo reacional, maior é o rendimento de glicose após hidrólise enzimática. Também foram observados altos rendimentos em uma ampla faixa de concentração de cal quando se trabalha com altas temperaturas, sendo, no entanto, o maior valor de rendimento encontrado para baixas concentrações.

Nota-se, portanto, que o modelo referente ao planejamento, na região investigada, define bem o processo, mas existe a necessidade de realizar novos experimentos para a otimização da etapa de pré-tratamento. Este procedimento é necessário porque no planejamento fatorial 2^3 realizado os pontos ótimos encontrados estão na extremidade do intervalo de condições operacionais consideradas, sendo necessário investigar se valores mais altos de rendimento podem ser encontrados além desta região.

O modelo linear se mostrou estatisticamente significativo apesar da análise indicar que o modelo quadrático descreveria melhor os dados experimentais (o modelo apresenta curvatura significativa ao se fazer a análise usando o software STATISTICA 7.0). Assim, para a otimização da etapa de pré-tratamento, foi utilizado o planejamento composto central para desenvolvimento de um modelo quadrático. Os resultados indicam ainda que seria interessante definir níveis com valores de tempo reacional e temperatura maiores que as já estudadas neste planejamento e que a massa de cal pode ser trabalhada na faixa já estudada ou em valores mais baixos.

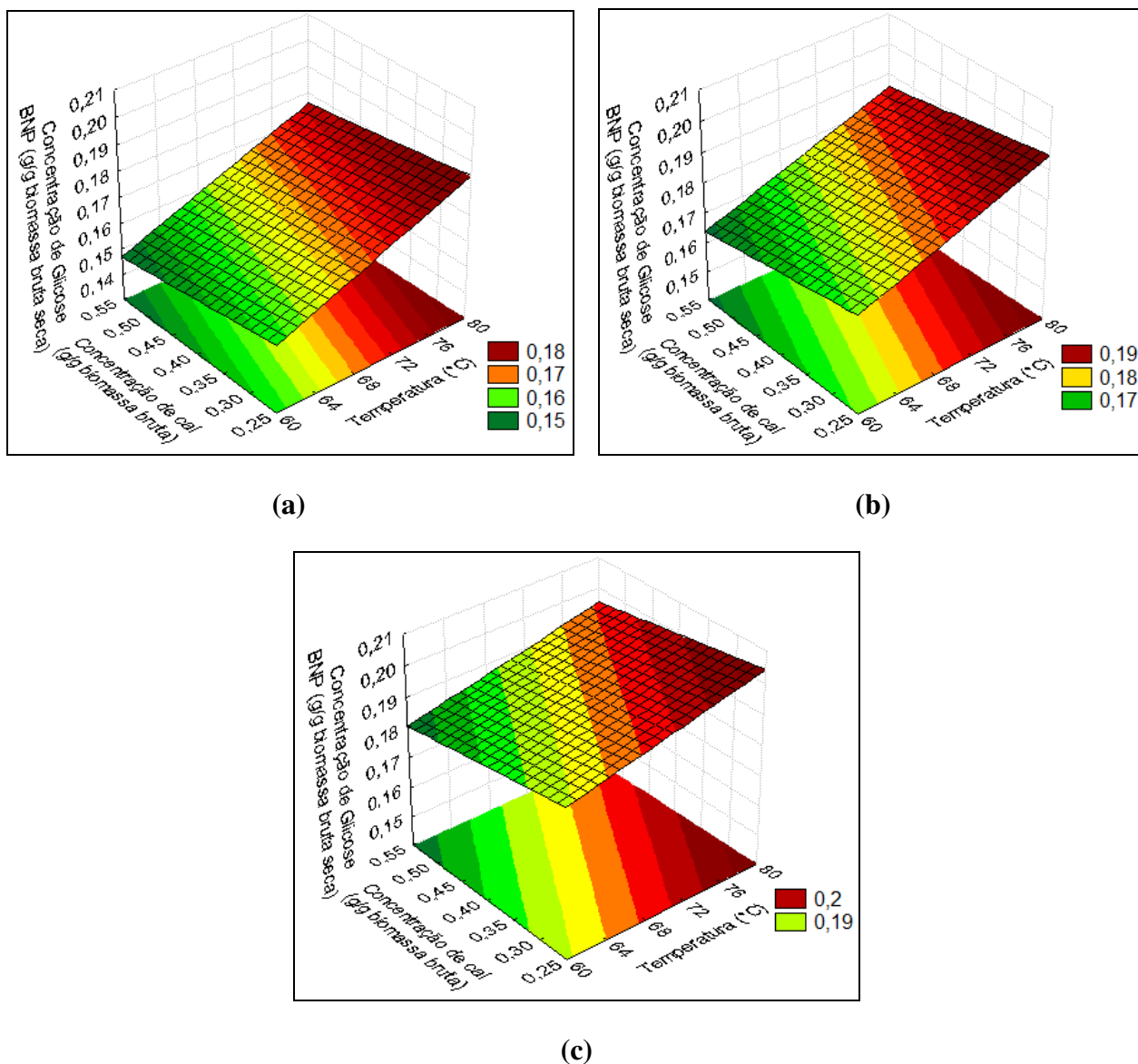


Figura 4.9: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

4.4.1.2.1.2. Análise da Concentração de Glicose – Bagaço Peneirado

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para a análise da concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço peneirado pode ser visualizada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,198	0,0011	187,1	*0,00003
Tempo (h)	0,0053	0,0012	4,27	*0,0507
Temperatura (°C)	0,0047	0,0012	3,79	*0,0632
Conc. de cal (g/g)	0,0004	0,0012	0,302	0,791
1*2	-0,0056	0,0012	-4,49	*0,0462
1*3	-0,0035	0,0012	-2,78	0,109
2*3	0,0017	0,0012	1,33	0,315
1*2*3	-0,0039	0,0012	-3,16	*0,0872

* Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

A Tabela 4.10 mostra que os efeitos principais tempo e temperatura, e as interações tempo/temperatura (1*2) e tempo/temperatura/concentração de cal (1*2*3) são considerados estatisticamente significativos a 90%. Nota-se que o efeito principal da concentração de cal não se mostrou significativo, apenas a interação 1*2*3, que está relacionada com a variável concentração apresentou significância.

Para determinar se o modelo é estatisticamente significativo foi realizada uma análise da variância (ANOVA) como mostra a Tabela 4.11.

Na Tabela 4.11 nota-se que o valor do teste F calculado foi maior que o valor tabelado, sendo os valores de 5,09 e 3,18, respectivamente. Logo, a equação do modelo linear que descreve a concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço peneirado pode ser considerada significativa a 90% de confiança. O modelo estudado também não apresentou

evidências de falta de ajuste pois o teste F calculado apresentou um valor de 4,12, que é menor que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{4,2} = 9,24$). Assim, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 4.11: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose do bagaço peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	0,000773	4	0,000193	5,09 ¹
Resíduos (r)	0,000228	6	0,000038	4,12 ²
Falta de ajuste (faj)	0,000203	4	0,000051	
Erro puro (ep)	0,000025	2	0,000012	
Total (T)	0,00100	10		
% de variação explicada (R^2)	77,25			
% máxima de variação explicável	97,54			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{4,6} = 3,18$ no nível de 90% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{4,2} = 9,24$ no nível de 90% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a equação que descreve o modelo linear (Equação 4.4). Os valores de tempo (t), temperatura (T) e concentração de cal (C) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$C_{\text{glicose liberada BP}} \text{ (g/g de biomassa bruta seca)} = 0,1981 + 0,0053t + 0,0047T - 0,0056tT - 0,0039tTC \quad 4.4$$

As superfícies de resposta para os resultados significativos podem ser visualizadas nas Figuras 4.10, 4.11 e 4.12.

• Superfície de Resposta para o Bagaço Peneirado – Concentração de Cal

A Figura 4.10 mostra a superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do bagaço peneirado em função do tempo e da temperatura. Nesta análise variou-se a concentração de cal nos pontos estudados no planejamento.

Ao analisarmos as superfícies de resposta da Figura 4.10 podemos perceber que a concentração de cal apresenta uma baixa influência no rendimento da glicose, sendo que melhores concentrações são conseguidas quando se trabalha com altos tempos e temperatura. Pode-se observar que para altos tempos, obtêm-se altos rendimentos para uma ampla faixa de temperatura e para altas temperaturas obtêm-se altos rendimentos para uma ampla faixa de tempos, o que sugere que basta que um dos fatores (tempo ou temperatura) precise ser mantido nos valores máximos.

Observa-se também que com o aumento da concentração de cal (a-b-c), há uma ligeira diminuição da concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática. Nota-se ainda que praticamente não há mais aumento da quantidade de glicose na faixa de tempo de 45 a 50 h e na temperatura de 76 a 80°C, dando a impressão de uma otimização nestas condições de pré-tratamento.

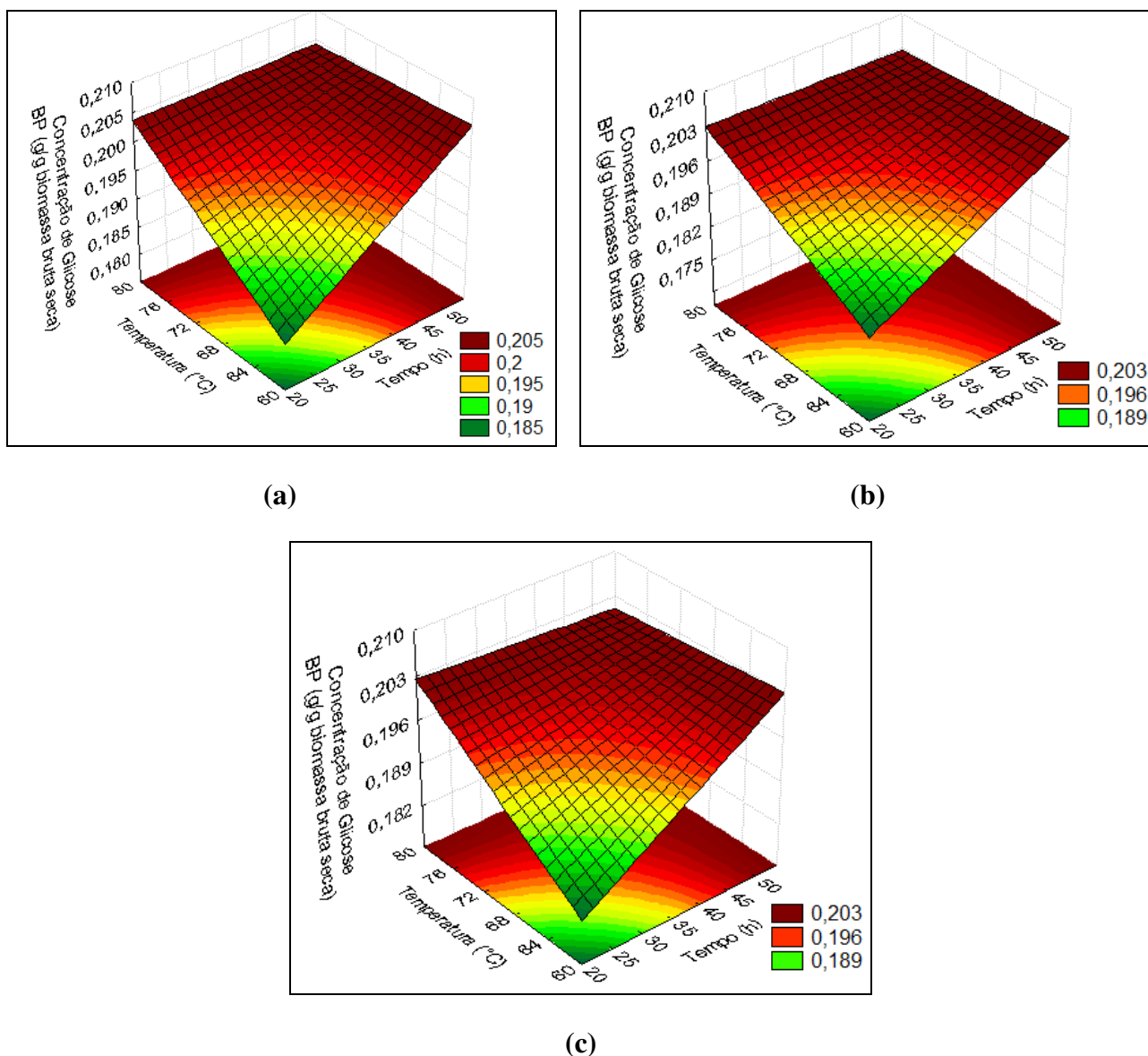


Figura 4.10: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

• Superfície de Resposta para o Bagaço Peneirado – Temperatura

A Figura 4.11 apresenta as superfícies de resposta para a concentração de glicose liberada quando a temperatura é variada durante a análise estatística.

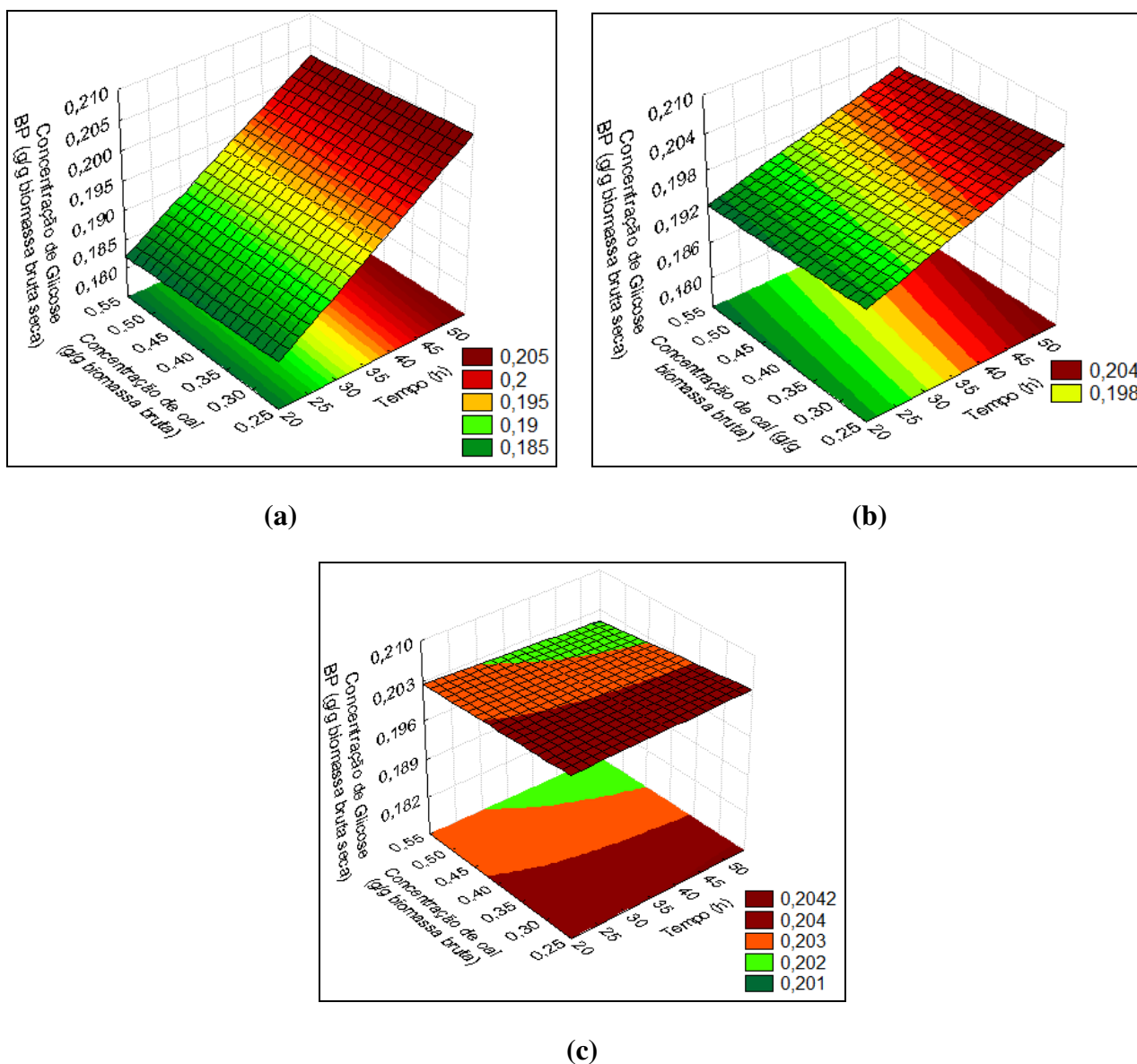


Figura 4.11: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

Observa-se que na Figura 4.11 (a) e (b), onde a temperatura tem seus valores fixados em 60 e 70°C, respectivamente, apresentam altos rendimentos de glicose em uma ampla faixa de concentração de cal para altos tempos de pré-tratamento. Já na Figura 4.11 (c), onde a

temperatura é mantida fixa em 80°C, os rendimentos são praticamente os mesmo trabalhando em quaisquer valores de tempo e concentração de cal estabelecidos pelo planejamento. Rendimentos ligeiramente maiores são obtidos em toda a faixa de tempo estudada no planejamento e menores concentrações de cal.

• Superfície de Resposta para o Bagaço Peneirado – Tempo

A variação do tempo em cada um dos níveis estudados pode ser observada nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.12.

Analisando a Figura 4.12 observa-se que à medida que o tempo aumenta, a influência dos outros fatores na concentração de glicose liberada após hidrólise é diminuída. Na Figura 4.12 (a) e (b), onde o tempo de pré-tratamento é mantido fixo em 20 e 37 h, observa-se que altas concentrações de glicose são obtidas em uma ampla faixa de concentração de cal, quando se trabalha com altas temperaturas. Quando o tempo é mantido fixo no nível máximo, 54 h, (Figura 4.12 c), altos rendimentos são obtidos em toda a superfície estudada. Resultados ligeiramente maiores são obtidos em menores temperaturas e concentração de cal.

Assim, os resultados indicam que para a otimização das condições de pré-tratamento utilizando o hidróxido de cálcio é necessário trabalhar em maiores tempos de reação, sendo que neste caso a temperatura e a concentração de cal apresentam efeitos menos importantes, sendo resultados ligeiramente melhores obtidos para menores temperaturas e concentrações de cal.

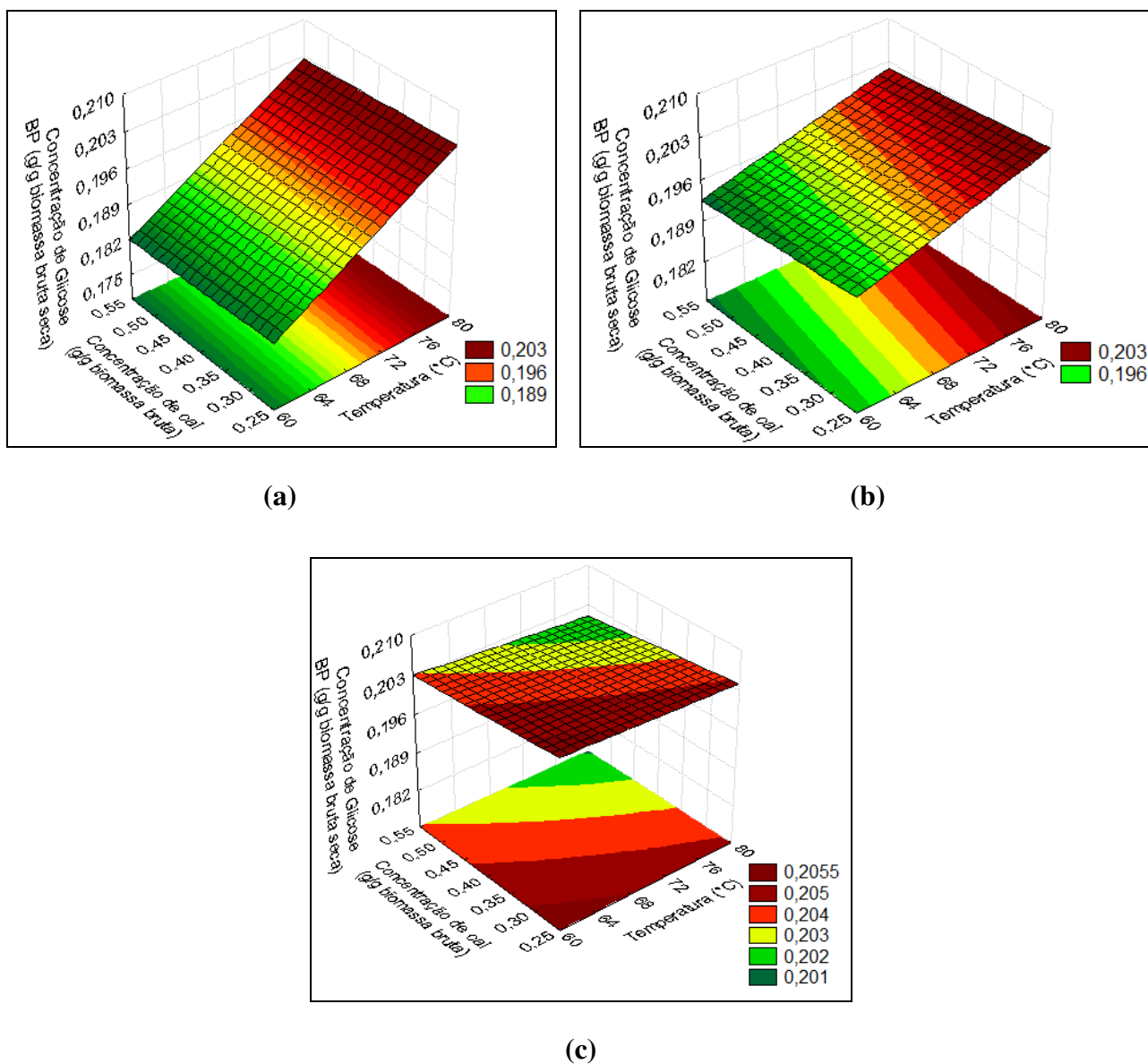


Figura 4.12: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (c).

4.4.2. Planejamento Fatorial 2^3 do Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino

Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, RABELO (2007) estudou, através de planejamento estatístico linear, 3 variáveis do processo: tempo reacional (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de H_2O_2 (% v/v). As análises foram realizadas para as amostras de bagaço não peneirado (BNP) e peneirado (BP).

A Tabela 4.12 apresenta a matriz de planejamento estudada com os resultados da perda de massa durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática, e a concentração dos açúcares liberados após hidrólise enzimática nas condições descritas na *seção 4.3.2 e 4.3.2.1*.

Foi observado que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino proporcionou uma maior solubilização e hidrólise da biomassa quando comparado com o pré-tratamento com hidróxido de cálcio (Figura 4.5). Observou-se que quanto maior as concentrações de peróxido de hidrogênio, maior a solubilização e hidrólise da biomassa.

A maior perda de massa durante o pré-tratamento e hidrólise foram obtidos para o bagaço não peneirado, sendo que 57,9% do bagaço foi solubilizado durante o pré-tratamento (ensaio 8) e 86,5% durante a hidrólise (ensaio 6).

A concentração de glicose obtida após hidrólise do bagaço pré-tratado com H_2O_2 alcalino foi maior do que para o pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Tabela 4.7), sendo a maior concentração obtida para o bagaço não peneirado, 0,309 g/g biomassa bruta seca, quando se trabalhou com altos tempos e concentrações de peróxido e menor temperatura (ensaio 6).

Os modelos propostos para descrever a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço não peneirado e peneirado pré-tratados com peróxido de hidrogênio alcalino foram considerados estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 4.12: Matriz de planejamento com os resultados da perda de massa durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática, e a concentração dos açúcares liberados em cada um dos ensaios para o bagaço pré-tratado com H₂O₂ alcalino (RABELO, 2007).

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	[H ₂ O ₂] (% v/v)	Perda de massa no pré-tratamento (%)		Massa hidrolisada (%)		Concentração de glicose (g/g)		Concentração de xilose (g/g)	
				BNP	BP	BNP	BP	BNP	BP	BNP	BP
1	6	20	1	22,2	30,2	26,2	37,1	0,065	0,103	0,156	0,156
2	24	20	1	23,4	31,9	27,6	37,0	0,080	0,098	0,150	0,178
3	6	60	1	18,1	43,7	52,6	60,7	0,215	0,167	0,239	0,186
4	24	60	1	32,5	46,5	41,5	63,1	0,121	0,182	0,159	0,168
5	6	20	5	45,5	49,7	63,4	72,7	0,242	0,239	0,157	0,168
6	24	20	5	28,4	48,2	68,6	86,5	0,309	0,228	0,185	0,224
7	6	60	5	48,7	55,9	70,8	65,2	0,253	0,189	0,162	0,140
8	24	60	5	47,9	57,9	77,6	67,8	0,288	0,163	0,159	0,139
9	15	40	3	38,9	51,6	58,5	63,3	0,230	0,168	0,129	0,170
10	15	40	3	43,2	47,1	56,8	65,1	0,209	0,195	0,140	0,180
11	15	40	3	39,5	49,7	53,0	60,7	0,205	0,165	0,139	0,177

4.5. Conclusões

Os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino mostraram-se efetivos em melhorar a acessibilidade da enzima durante a etapa de hidrólise, tanto para o bagaço não peneirado quanto para o peneirado. Foi observado ainda que a não execução desta etapa proporciona baixos rendimentos de glicose após a hidrólise enzimática. A concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática do bagaço não tratado foi de 0,008 g/g biomassa bruta, para o bagaço não peneirado e 0,012 g/g biomassa bruta, para o bagaço peneirado.

O pré-tratamento com hidróxido de cálcio proporcionou rendimentos de glicose similares para o bagaço não peneirado e peneirado, de 0,202 g/g biomassa bruta seca e 0,211 g/g biomassa bruta seca, respectivamente. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o bagaço não peneirado levou a resultados melhores em termos de quantidade de glicose liberada após hidrólise se comparado com o bagaço peneirado, 0,309 g/g biomassa bruta seca e 0,239 g/g biomassa bruta seca, respectivamente.

Comparando os dois pré-tratamento foi possível observar que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou-se mais eficiente, proporcionando uma maior liberação de glicose após a hidrólise enzimática.

Em relação às análises estatísticas, para os dois pré-tratamentos foi possível propor modelos lineares estatisticamente significativos a 90% de confiança para descrever as concentrações de glicose liberadas em função dos fatores considerados.

Visando a otimização da etapa de pré-tratamento, foi necessária a execução de novos experimentos, já que em todas as superfícies de resposta, para ambos os pré-tratamentos, observaram-se valores maiores de concentração de glicose nas extremidades.

CAPÍTULO 5

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO

Neste capítulo é apresentada a escolha do bagaço a ser utilizado na etapa de otimização do pré-tratamento sendo descritas todas as análises e resultados do planejamento estatístico composto central visando à otimização do pré-tratamento com Ca(OH)_2 . Além disso, são apresentados os resultados mais relevantes da otimização do pré-tratamento com H_2O_2 alcalino, determinado anteriormente por RABELO (2007).

5.1. Introdução

Um obstáculo importante na implementação de pré-tratamentos está relacionado com o alto custo deste, associado com a quantidade de enzima necessária para um alto rendimento do processo. Apesar dos altos custos, o pré-tratamento é um pré-requisito essencial para alterar características estruturais da biomassa, melhorando assim a susceptibilidade da biomassa à hidrólise enzimática (CHANG, 1999, HOLTZAPPLE e CHANG, 2000).

Avaliações econômicas dos processos que convertem biomassa em bioetanol indicam que o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais caras, representando cerca de um terço do custo global de processamento (LYND *et al.*, 1996).

Assim, é de suma importância a otimização da etapa de pré-tratamento, já que assim ele poderá proporcionar maiores rendimentos de açúcares fermentescíveis por quantidade de biomassa utilizada.

5.2. Materiais

5.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de otimização da etapa de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática, foram utilizados os reagentes químicos listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido acético	Chemco	99,7
Ácido clorídrico	Merck	37
Hidróxido de cálcio	Merck	≥ 96
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95
Peróxido de hidrogênio	Ecibra	30

Além dos reagentes, as enzimas, previamente analisadas como apresentado nas seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, e os padrões cromatográficos, apresentados na Tabela 3.1 também foram utilizados.

5.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;
- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;

- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo MA-832 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS TecnoPON, com precisão de 0,01;
- Peneiras circulares
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

5.3. Procedimento Experimental

5.3.1. Otimização das Condições de Pré-Tratamento

Após ensaios iniciais, as melhores condições de pré-tratamento foram selecionadas para otimização desta etapa. Para isso, foram realizados novos experimentos abordando uma nova faixa de estudo estabelecida de acordo com os resultados obtidos no Capítulo 4. Para selecionar o tamanho de partícula do bagaço a se trabalhar durante a etapa de otimização, foi levado em consideração a concentração de glicose liberada na etapa anterior, além, claro, das condições de processo.

Para esta etapa foi utilizada, para análise, a metodologia de superfície de resposta (planejamento composto central). O estudo foi repetido várias vezes até atingir a região ótima de interesse da superfície investigada.

A execução destes novos experimentos de pré-tratamento foi realizada como descrito na *seção 4.3.1.1*, hidrolisados e quantificados como descritos na *seção 4.3.2* e *4.3.2.1*, respectivamente.

Essas concentrações obtidas foram então utilizadas para análise, juntamente com os dados do planejamento composto central dos pré-tratamentos, visando à otimização desta etapa através da maximização da liberação de glicose. As análises também foram realizadas através do programa computacional STATISTICA 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK), como descrito anteriormente na *seção 4.3.3*.

5.4. Resultados e Discussões

5.4.1. Escolha da Biomassa e Condições de Otimização

Para determinar qual tamanho de bagaço seria selecionado para o processo de otimização, foi levada em consideração a análise dos resultados de rendimento de glicose, consumo de reagentes e custo operacional de redução do tamanho da partícula.

Para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio observou-se que as superfícies de respostas apresentadas nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10, para o bagaço não peneirado, e nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 para o bagaço peneirado apresentam o mesmo perfil. Em ambos os materiais, para se otimizar a etapa de pré-tratamento, é necessário trabalhar em maiores temperaturas e tempos de reação, sendo possível executar os experimentos em uma ampla faixa de concentração de reagente para se obter altos rendimentos.

Foi observado ainda que os dois bagaços necessitariam das mesmas variações das condições operacionais para serem otimizados. Logo, a quantidade de reagente foi desconsiderada na tomada de decisão do bagaço a ser otimizado.

Analizando a Tabela 4.7 é possível observar que o melhor rendimento de glicose para o bagaço não peneirado foi obtido no ensaio 4 (54 h, 80°C, 0,25 g/g) sendo de 0,202 g/g biomassa bruta seca. Para o bagaço peneirado o melhor resultado pode ser observado no ensaio 7 (20 h, 80°C, 0,55 g/g), com uma concentração liberada de glicose de 0,211 g/g biomassa bruta seca. Nota-se que pelas condições estabelecidas pelas superfícies de resposta para os dois bagaços (maiores temperaturas e tempos, ampla faixa de concentração de cal) os melhores rendimentos seriam obtidos para os ensaios 4 (54 h, 80°C, 0,25 g/g) e 8 (54 h, 80°C, 0,55 g/g). Para esses dois casos, observou-se que a diferença entre a concentração de glicose liberada para os dois bagaços é mínima: 0,202 g/g biomassa bruta para o bagaço não peneirado e 0,206 g/g biomassa bruta para o bagaço peneirado, no ensaio 4 e 0,193 g/g biomassa bruta para o bagaço não peneirado e 0,196 g/g biomassa bruta para o bagaço peneirado, no ensaio 8. Esta diferença não foi considerada significativa.

Além dos rendimentos, outro fator importante considerado foi que utilizando o bagaço não peneirado conseguiu-se um maior aproveitamento da matéria prima como um todo, já que grande parte do material (85,59%) foi desprezada no estudo do bagaço peneirado. Ainda, o fato de não ser necessário peneirar o bagaço faz com que uma operação unitária a menos seja necessária no processo, o que diminui bastante os custos.

Diante de todas as observações mencionadas, foi selecionado para o processo de otimização do pré-tratamento com hidróxido de cálcio o bagaço de cana não peneirado.

Segundo RABELO (2007), utilizando os mesmos parâmetros de análise deste estudo, observou que o bagaço não peneirado pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino apresentou melhores rendimentos de glicose após hidrólise enzimática nas condições estudadas, sendo assim selecionado para a etapa de otimização do pré-tratamento.

5.4.2. Otimização do Pré-Tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

A otimização das condições de pré-tratamento do bagaço não peneirado utilizando hidróxido de cálcio foi baseada nas superfícies de resposta do planejamento linear. O aumento da concentração de glicose liberada no meio reacional ocorreu em altos tempos e temperaturas de pré-tratamento e em uma ampla faixa de concentração do reagente. Assim, como todas as variáveis apresentavam significância estatística no ensaio inicial, no novo ensaio estas foram modificadas segundo as condições necessárias para a maximização dos açúcares fermentescíveis.

5.4.2.1. Planejamento Composto Central para a Otimização do Pré-Tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Neste novo planejamento foram estudadas as 3 variáveis do processo anteriormente estabelecidas: tempo reacional (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de cal (g/g biomassa bruta seca). Os valores decodificados e codificados, para cada uma das variáveis são apresentados na Tabela 5.2, juntamente com as porcentagens de deslignificação e solubilização da hemicelulose

determinadas para cada condição de pré-tratamento, de acordo com a metodologia descrita no *apêndice V*.

Tabela 5.2: Faixa de valores estudados no planejamento composto central para o bagaço pré-tratado com Ca(OH)_2 e porcentagem de deslignificação e solubilização da hemicelulose.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração de cal (g/g)	Deslignificação (%)	Solubilização da hemicelulose (%)
1*	65 (-1)	86 (-1)	0,25 (-1)	63,4	41,9
2*	65 (-1)	86 (-1)	0,55 (+1)	61,2	39,2
3*	65 (-1)	94 (+1)	0,25 (-1)	69,2	43,8
4*	65 (-1)	94 (+1)	0,55 (+1)	59,5	49,5
5*	100 (+1)	86 (-1)	0,25 (-1)	71,0	48,2
6*	100 (+1)	86 (-1)	0,55 (+1)	52,5	59,9
7*	100 (+1)	94 (+1)	0,25 (-1)	69,3	43,6
8*	100 (+1)	94 (+1)	0,55 (+1)	69,4	34,0
9*	53,1 (-1,41)	90 (0)	0,40 (0)	43,0	47,4
10*	111,9 (+1,41)	90 (0)	0,40 (0)	64,7	60,0
11*	82,5 (0)	83,3 (-1,41)	0,40 (0)	67,2	45,5
12*	82,5 (0)	96,7 (+1,41)	0,40 (0)	68,6	52,9
13*	82,5 (0)	90 (0)	0,1477 (-1,41)	70,9	47,9
14*	82,5 (0)	90 (0)	0,6523 (+1,41)	54,7	47,6
15*	82,5 (0)	90 (0)	0,40 (0)	69,5	37,0
16*	82,5 (0)	90 (0)	0,40 (0)	71,0	46,1
17*	82,5 (0)	90 (0)	0,40 (0)	69,3	44,0

5.4.2.1.1. Neutralização da Cal no Processo de Otimização do Pré-Tratamento

Após a etapa de pré-tratamento, a cal restante no meio foi neutralizada e quantificada segundo metodologia descrita no *apêndice X*. Foi realizada a análise da composição química para cada um dos ensaios, segundo metodologia descrita nos *apêndices III, IV e V*. O objetivo foi relacionar a deslignificação do material com o consumo de cal. O cálculo da deslignificação foi apresentado no *apêndice XI*.

A Figura 5.1 mostra a porcentagem de cal consumida após a etapa de pré-tratamento do bagaço não peneirado e a deslignificação ocorrida para cada um dos ensaios.

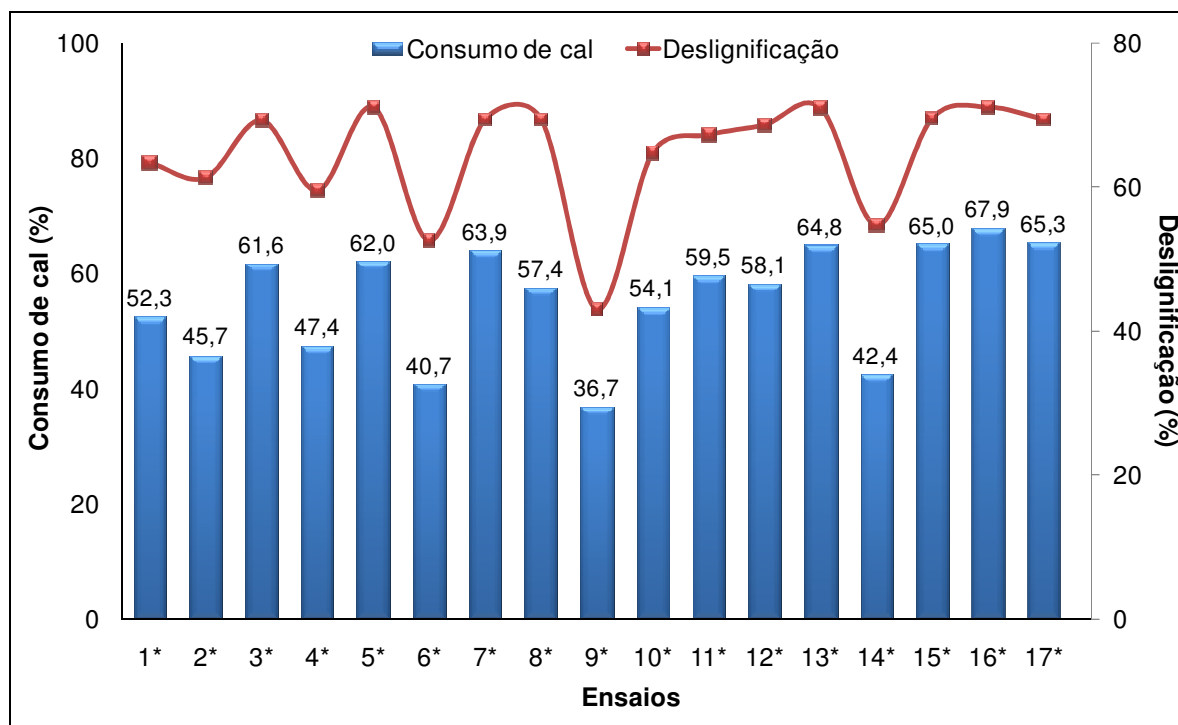


Figura 5.1: Porcentagem de cal consumida e deslignificação após pré-tratamento segundo o planejamento composto central.

Analisando a Figura 5.1 observa-se que a porcentagem de cal consumida aumentou consideravelmente em relação à quantidade consumida no planejamento linear (Figura 4.2).

As maiores porcentagens de consumo de cal foram observadas nos ensaios do ponto central (15*, 16* e 17*), com consumo médio de 66,1%, quando o bagaço foi pré-tratado a 82,50 h, 90°C e 0,4 g/g biomassa bruta seca de cal. Já a menor porcentagem de consumo de cal foi obtida no ensaio 9*, com 36,7% da cal sendo utilizada no pré-tratamento. As condições operacionais para este ensaio foram 53,1 h, 90°C e 0,4 g/g biomassa bruta seca de cal.

Com isso é possível observar que a diferença entre a maior e menor porcentagem de consumo de cal está diretamente relacionada com o tempo de contato deste com a biomassa, uma

vez que esta é a única variável que difere nos dois ensaios. Além disso, foi possível observar uma relação direta entre a porcentagem de consumo de cal e o grau de deslignificação.

5.4.2.1.1.1. Análise Estatística do Consumo da Cal para o Planejamento Composto Central

Para verificar a relação entre a porcentagem de consumo da cal durante a etapa de pré-tratamento e as demais variáveis do processo (tempo, temperatura, concentração de cal) realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Figura 5.1.

A análise dos efeitos principais e das interações das variáveis para a porcentagem de cal consumida, após cada um dos ensaios, pode ser vista na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Coeficientes de regressão para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do planejamento composto central.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	65,9	0,917	71,9	*0,0002
(1) Tempo (°C) (L)	3,38	0,430	7,849	*0,0159
Tempo (°C) (Q)	-6,83	0,474	-14,49	*0,0048
(2) Temperatura (°C) (L)	1,99	0,431	4,62	*0,0438
Temperatura (°C) (Q)	-2,09	0,474	-4,41	*0,0477
(3) Conc. de cal (g/g) (L)	-6,32	0,431	-14,7	*0,0046
Conc. de cal (g/g) (Q)	-3,93	0,474	-8,29	*0,0142
1*2 (L)	0,962	0,563	1,71	0,229
1*3 (L)	-0,870	0,563	-1,55	0,262
2*3 (L)	0,904	0,563	1,61	0,249

* Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Analisando a Tabela 5.3 nota-se que apenas o efeito das interações tempo/temperatura (1*2), tempo/concentração de cal (1*3) e temperatura/concentração de cal (2*3) não se

mostraram estatisticamente significativas a 95% de confiança. Logo, estas interações foram eliminadas do modelo e consideradas erros aleatórios experimentais.

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Análise da variância (ANOVA) para a porcentagem de cal consumida após pré-tratamento do bagaço segundo o planejamento composto central.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	1328,5	6	221,4	11,73 ¹
Resíduos (r)	188,7	10	18,9	9,07 ²
Falta de ajuste (faj)	183,7	8	23,0	
Erro puro (ep)	5,06	2	2,53	
Total (T)	1517,2	16		
% de variação explicada (R^2)	87,56			
% máxima de variação explicável	99,67			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{6,10} = 3,22$ no nível de 95% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{8,2} = 19,37$ no nível de 95% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da Tabela 5.4, observa-se que o valor do teste F calculado de 11,73 é superior ao tabelado ($F(\text{tab.})_{6,10} = 3,22$). O modelo não apresenta evidência de falta de ajuste, pois o valor de F calculado é 9,07, menor que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{8,2} = 19,37$). Assim, o modelo encontrado é estatisticamente significativo e preditivo para a porcentagem de cal consumida.

A porcentagem de cal consumida durante o pré-tratamento do bagaço não peneirado pode ser descrita pela Equação 5.1. Os valores de tempo (t), temperatura (T) e concentração de cal (C) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$\% \text{ Ca(OH)}_2 \text{ consumida}_{BNP \text{ otimização}} = 65,89 + 3,377 t - 6,833 t^2 + 1,989 T - 2,091 T^2 - 6,921 C - 3,929 C^2 \quad 5.1$$

As superfícies de resposta, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas na Figura 5.2.

Pode-se observar analisando a Figura 5.2 que a maior porcentagem de cal consumida ocorre em condições reacionais próximas ao ponto central (82,5 h, 90°C, 0,40 g/g). Nota-se que à medida que a concentração de cal aumenta (Figura 5.2 a-b-c), a porcentagem do reagente consumida pelo pré-tratamento diminui.

Assim, como o consumo do reagente cal está diretamente relacionado com a degradação/solubilização da lignina e hemicelulose, parece que as condições acima mencionadas são resultados de melhores rendimentos de hidrólise.

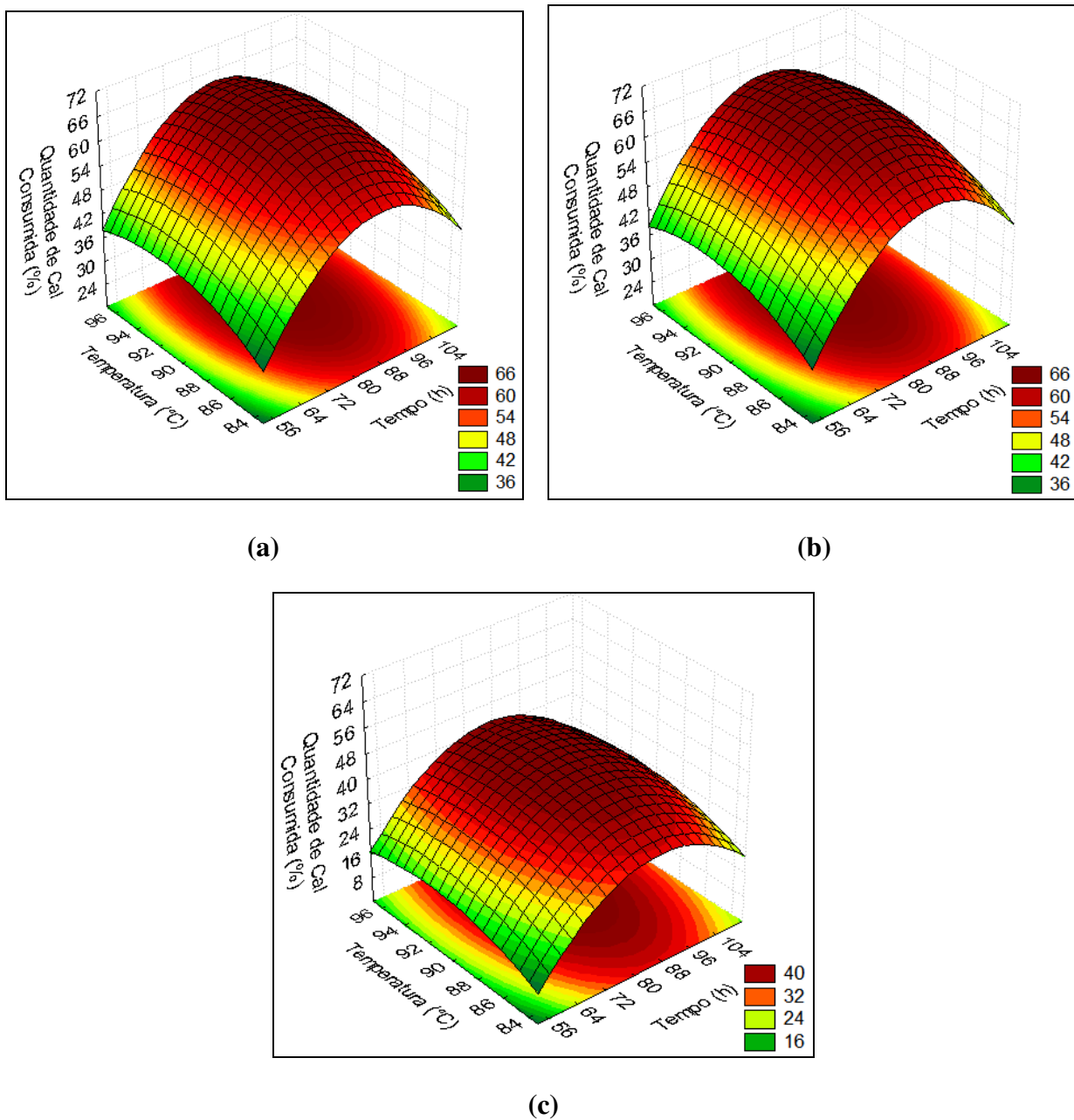


Figura 5.2: Superfície de resposta para a porcentagem de cal consumida em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).

5.4.2.1.2. Hidrólise e Quantificação dos Açúcares para o Planejamento Composto Central com Ca(OH)_2

Após o pré-tratamento, segundo as condições descritas na Tabela 5.2, o material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática para liberação e quantificação dos açúcares fermentescíveis. As condições reacionais e metodologia da hidrólise estão descritas na *seção 4.3.1.1 e 4.3.2*.

A Figura 5.3 apresenta a porcentagem de massa solubilizada e/ou hidrolisada após o pré-tratamento de 4,0 g de bagaço e a massa hidrolisada após a hidrólise enzimática de 1,0 g de bagaço não peneirado pré-tratado segundo as condições do planejamento composto central.

Analisando a Figura 5.3 percebe-se uma maior perda de massa nos ensaios 6* (100 h, 86°C, 0,55 g/g) e 10* (111,9 h, 90°C, 0,40 g/g), sendo 49,60% e 49,71% do material solubilizado/degradado durante o pré-tratamento nestas condições, respectivamente. A menor perda de massa ocorreu para os ensaios 8* (100 h, 94°C, 0,55 g/g) e 13* (82,5 h, 90°C, 0,1477 g/g), sendo 34,25% e 34,41% perdidos durante a etapa de pré-tratamento, respectivamente.

Em relação à hidrólise, observa-se na Figura 5.3 que em todos os ensaios houve a hidrólise de mais de 58% do bagaço pré-tratado. A maior massa hidrolisada se deu para o ensaio 10* (111,9 h, 90°C e 0,4 g/g biomassa seca) onde 76,40% da massa foi hidrolisada. A menor massa hidrolisada ocorreu para o ensaio 9* (53,1 h, 90°C e 0,40 g/g biomassa seca) com 58,50% da biomassa hidrolisada pelas enzimas.

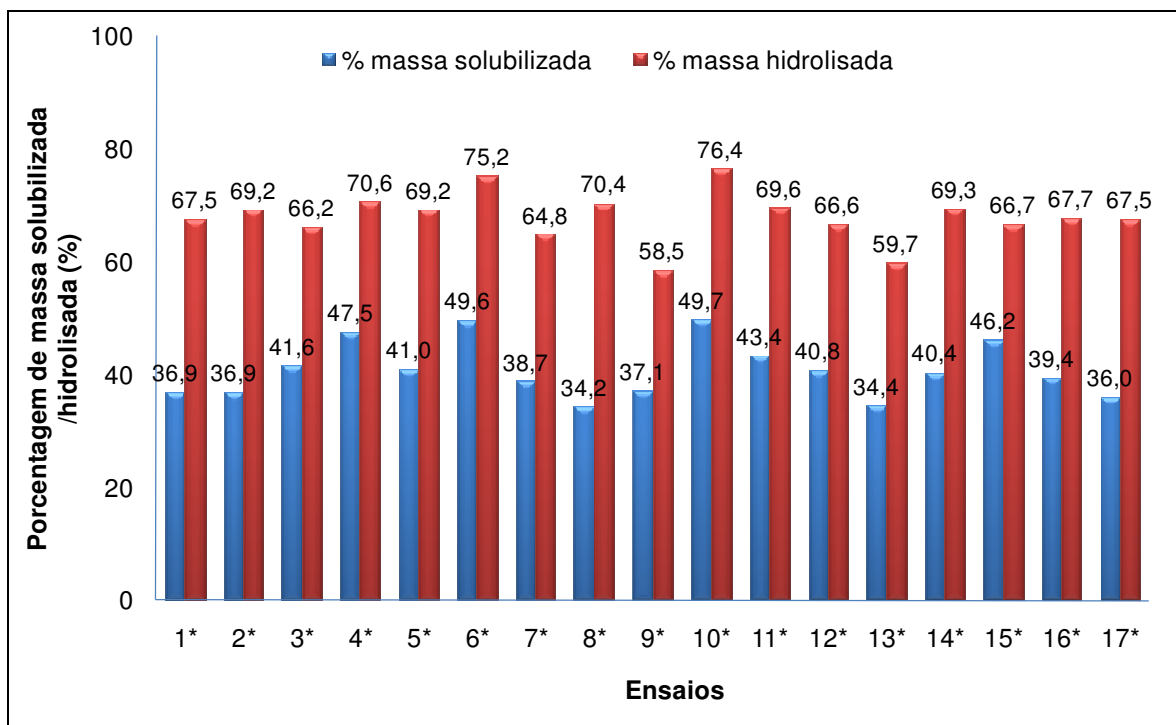
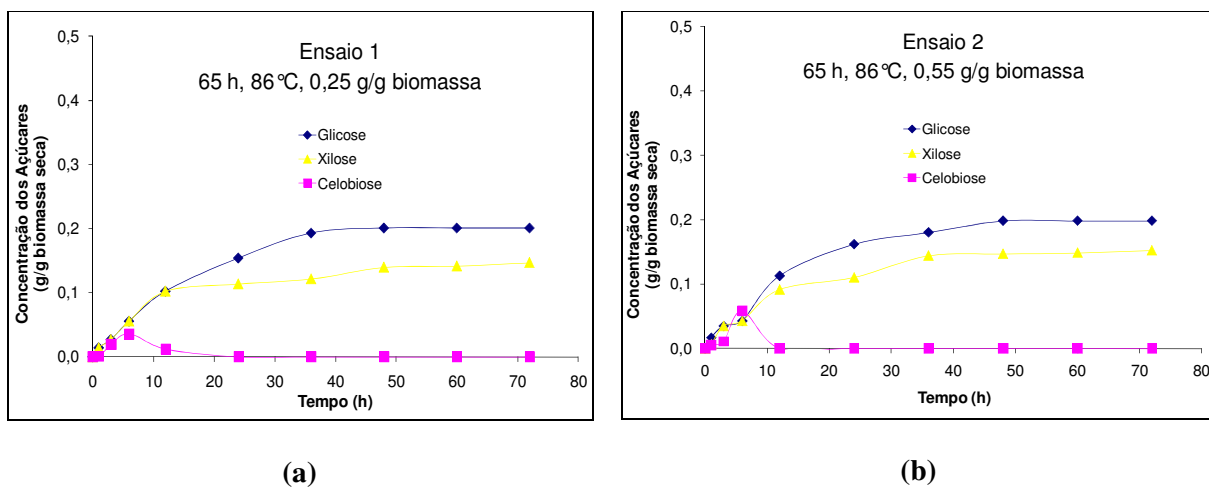
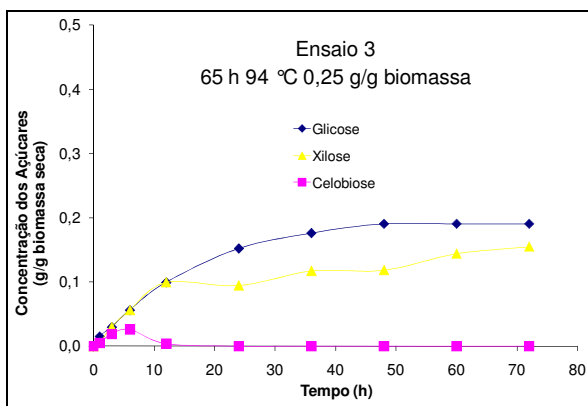


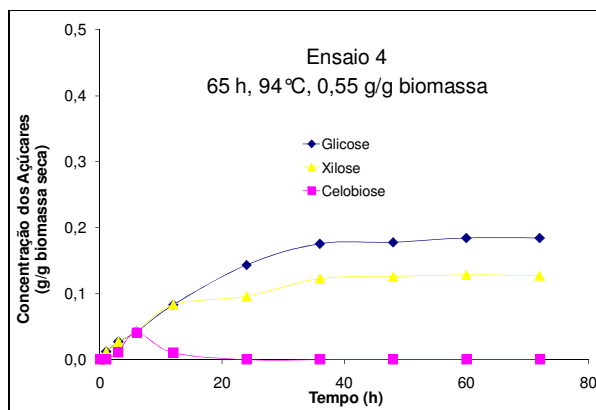
Figura 5.3: Porcentagem de bagaço solubilizada após o pré-tratamento de 4 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado.

Para todos os ensaios foram analisadas a concentração dos carboidratos liberadas em função do tempo de hidrólise. A Figura 5.4 (a-r) mostra estes perfis de hidrólise para todos os ensaios.

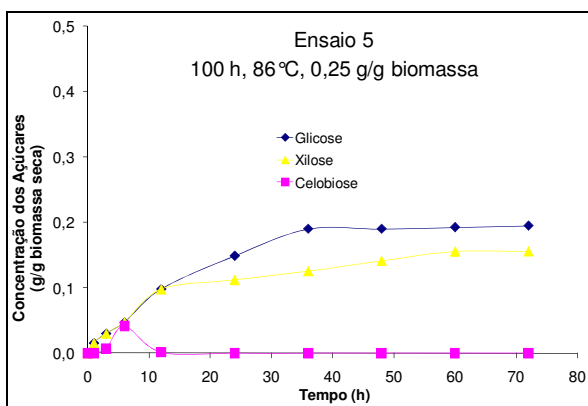




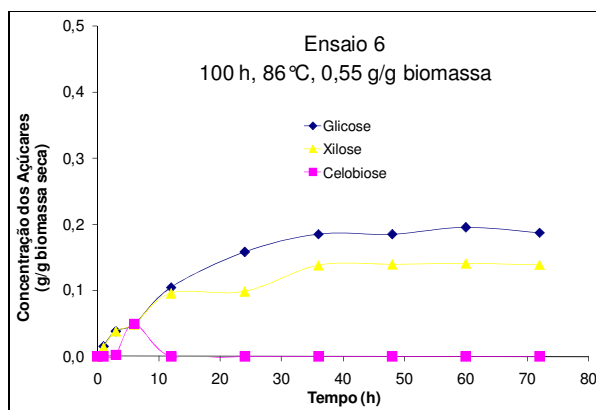
(c)



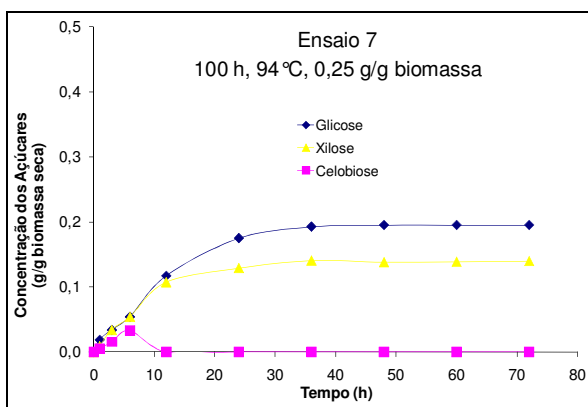
(d)



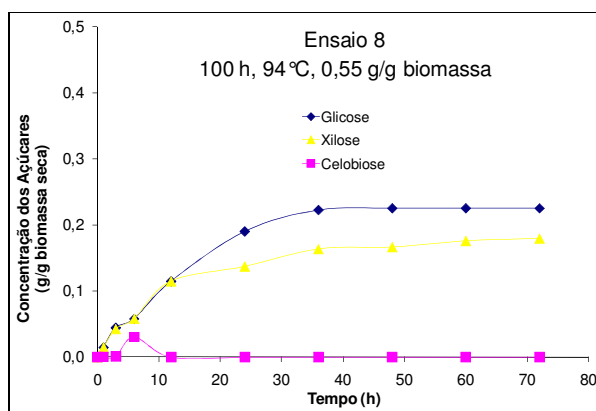
(e)



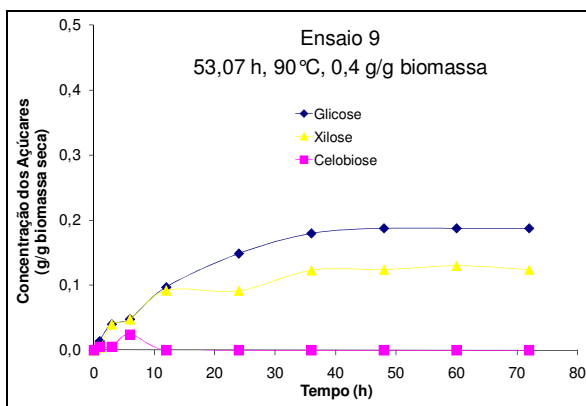
(f)



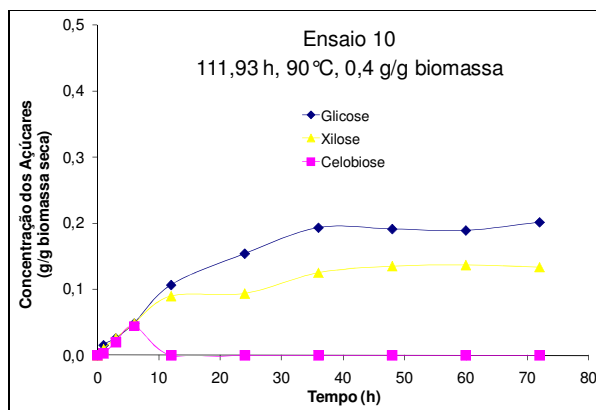
(g)



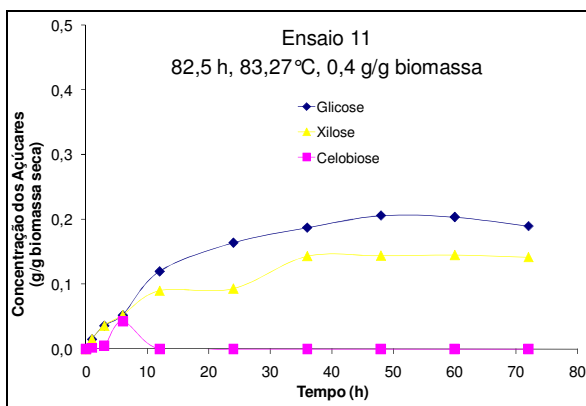
(h)



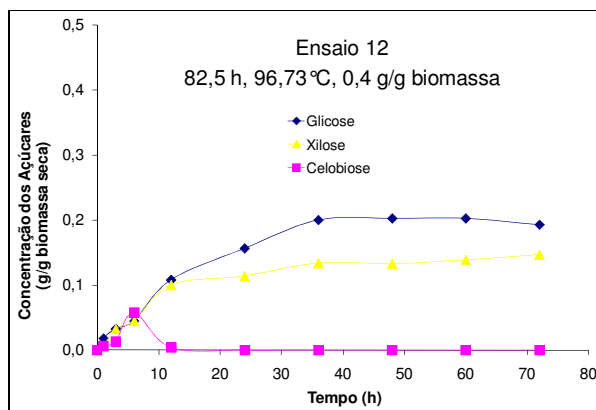
(i)



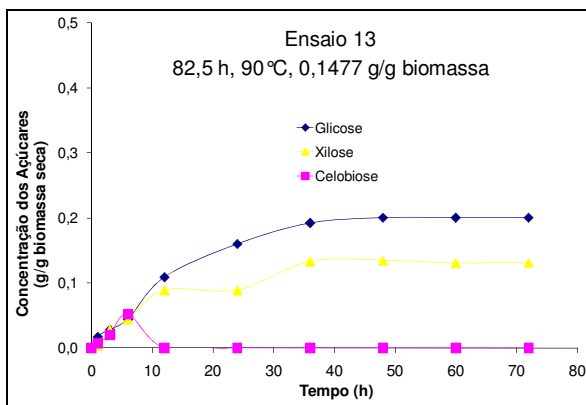
(j)



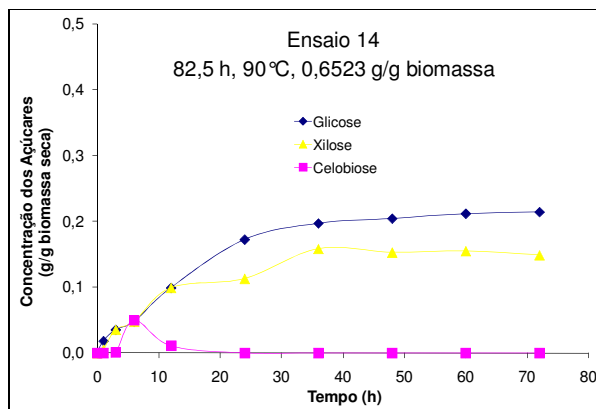
(l)



(m)



(n)



(o)

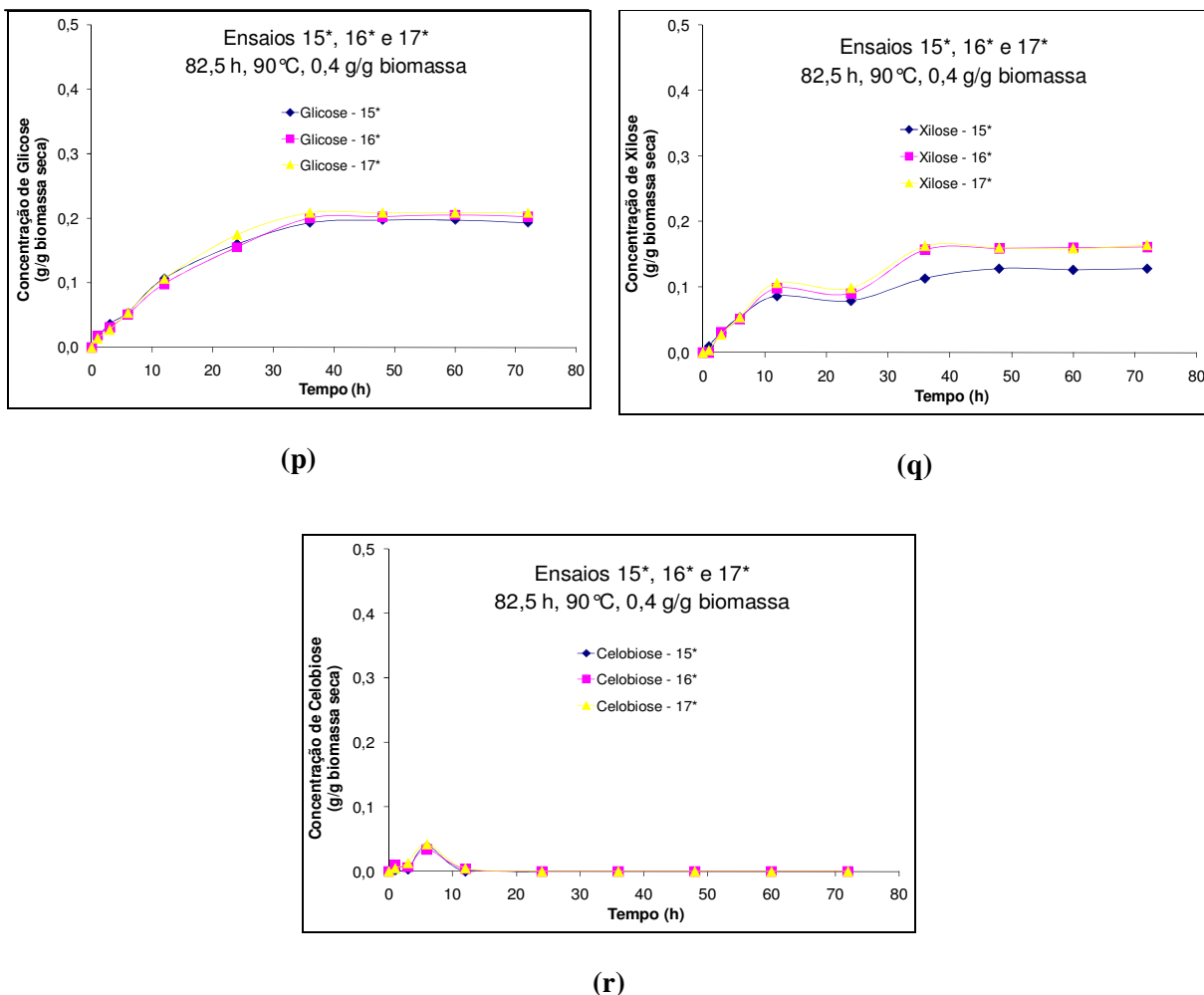


Figura 5.4: Perfis de hidrólise dos ensaios do planejamento estatístico composto central para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Ao analisarmos a Figura 5.4 observa-se que houve um aumento considerável da quantidade de glicose liberada no meio reacional após hidrólise enzimática em relação aos ensaios do planejamento linear. Observa-se também que a quantidade de xilose liberada no meio reacional diminuiu se comparada com o processo de hidrólise anterior (Figura 4.6).

5.4.2.1.2.1. Determinação dos Efeitos Principais e de Interação das Variáveis do Planejamento Composto Central para o $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Após a análise dos perfis de hidrólise para cada ensaio do planejamento composto central, as concentrações de glicose liberadas no meio reacional foram utilizadas para a análise estatística. O ponto escolhido foi o de estabilização da reação que variou de 48 a 72 h de hidrólise.

A Tabela 5.5 apresenta a concentração de glicose e xilose liberadas experimentalmente em cada combinação de níveis e o rendimento global da celulose obtidos após pré-tratamento e hidrólise da biomassa, calculados através da equação descrita no apêndice XI. Os ensaios 15*, 16* e 17* são repetições do ponto central. As concentrações foram expressas como g/g biomassa bruta seca (sem pré-tratamento). O rendimento global foi expresso como a conversão da celulose em glicose já que não houve acúmulo de celobiose no meio reacional. São marcados em negrito os melhores resultados obtidos nos ensaios para cada resposta considerada.

Analizando a Tabela 5.5 observa-se que os maiores concentrações de glicose e xilose foram obtidos no ensaio 8*, onde o tempo, a temperatura e a concentração de cal foram mantidos no ponto +1 do planejamento composto central. Nota-se também que os resultados do ponto central 15*, 16* e 17* (82,5 h, 90°C, 0,40 g/g) são bastante similares aos do ensaio 8*.

A Figura 5.5 mostra o rendimento global para a celulose após pré-tratamento e hidrólise do bagaço não peneirado e a porcentagem de deslignificação em cada um dos ensaios do planejamento composto central para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Tabela 5.5: Matriz de planejamento com os resultados das concentrações de carboidratos e rendimentos de glicose para cada um dos ensaios do planejamento composto central do pré-tratamento com Ca(OH)_2 .

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Cal (g/g)	Glicose (g/g)	Xilose (g/g)	Rendimento global da celulose (%)
1*	65	86	0,25	0,201	0,140	44,6
2*	65	86	0,55	0,198	0,147	44,1
3*	65	94	0,25	0,191	0,119	42,4
4*	65	94	0,55	0,184	0,128	41,0
5*	100	86	0,25	0,195	0,156	43,3
6*	100	86	0,55	0,196	0,141	43,5
7*	100	94	0,25	0,195	0,138	43,3
8*	100	94	0,55	0,226	0,167	50,1
9*	53,1	90	0,40	0,187	0,124	41,6
10*	111,9	90	0,40	0,191	0,135	42,5
11*	82,5	83,3	0,40	0,206	0,144	45,7
12*	82,5	96,7	0,40	0,203	0,133	45,1
13*	82,5	90	0,1477	0,201	0,135	44,6
14*	82,5	90	0,6523	0,215	0,149	47,8
15*	82,5	90	0,40	0,218	0,128	48,5
16*	82,5	90	0,40	0,222	0,159	49,4
17*	82,5	90	0,40	0,225	0,160	50,0

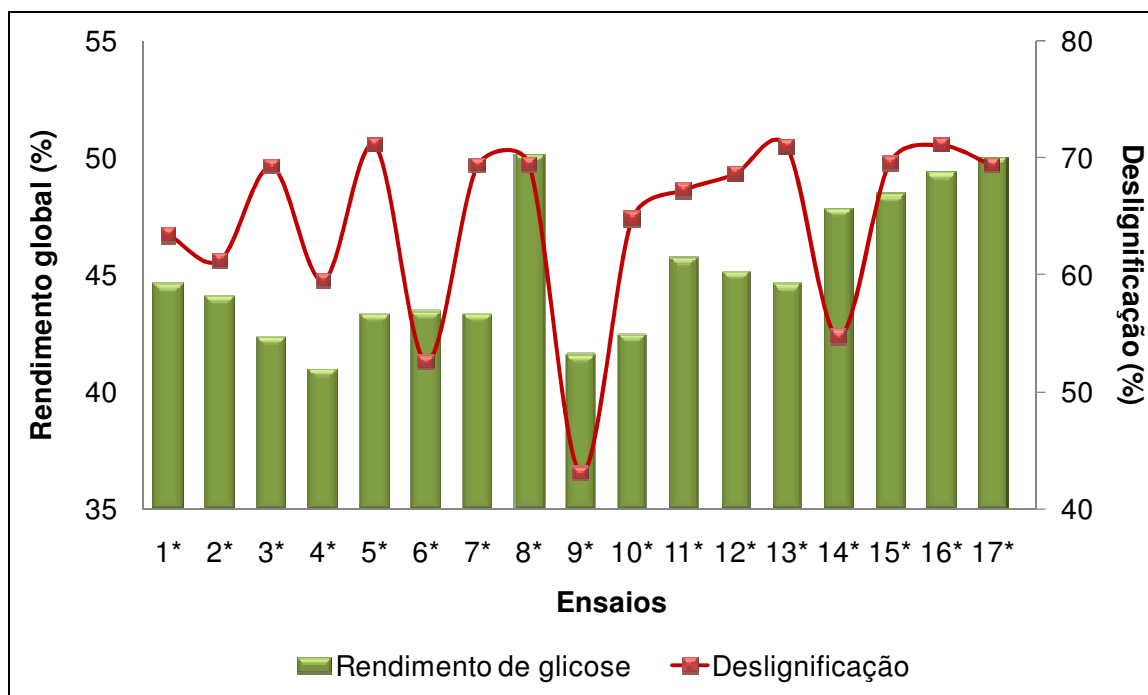


Figura 5.5: Rendimento global e porcentagem de deslignificação para cada um dos ensaios do planejamento composto central do pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Analizando a Figura 5.5 observam-se rendimentos de glicose muito similares para todos os ensaios. O melhor resultado foi observado para o ensaio 8* (100 h, 94°C, 0,55 g/g), sendo que 50,1% da celulose foi hidrolisada. O menor rendimento foi obtido nas condições do ensaio 4* (65 h, 94°C, 0,55 g/g) sendo 41,0% da celulose hidrolisada após etapa de pré-tratamento e hidrólise. É possível observar que a diferença nas condições de pré-tratamento para os dois ensaios está relacionada apenas com a variável tempo, o que leva a entender que maiores tempos de pré-tratamento são necessários para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise enzimática e assim aumentar os rendimentos de glicose.

Observa-se ainda que o grau de deslignificação não é o único fator importante para a obtenção de altos rendimentos de glicose uma vez que ensaios com uma menor deslignificação (ensaio 9*) apresentam rendimentos de glicose maiores do que ensaios com maior deslignificação (ensaio 4*).

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando o erro puro e o software STATISTICA (Statsoft, v. 7.0).

5.4.2.1.2.1.1. Análise da Concentração de Glicose – Otimização das Condições de Pré-Tratamento com Ca(OH)_2

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para a etapa de otimização do pré-tratamento com hidróxido de cálcio pode ser vista na Tabela 5.6, quando a resposta é a concentração liberada de glicose durante o processo de hidrólise.

Tabela 5.6: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,222	0,00205	108,2	*0,000085
(1) Tempo (°C) (L)	0,00320	0,000963	3,32	*0,0801
Tempo (°C) (Q)	-0,0118	0,00106	-11,1	*0,00800
(2) Temperatura (°C) (L)	0,000085	0,000963	0,0886	0,937
Temperatura (°C) (Q)	-0,00637	0,00106	-6,01	*0,0266
(3) Conc. de cal (g/g) (L)	0,00343	0,000963	3,57	*0,0704
Conc. de cal (g/g) (Q)	-0,00511	0,00106	-4,83	*0,0403
1*2 (L)	0,00675	0,00126	5,37	*0,0330
1*3 (L)	0,00498	0,00126	3,96	*0,0582
2*3 (L)	0,00324	0,00126	2,57	0,124

* Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

Analisando a Tabela 5.6 nota-se que o efeito linear da temperatura e a interação linear dos efeitos da temperatura/concentração de cal (2*3) não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Para analisar a resposta do experimento através da superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo é descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 5.7.

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos expostos na Tabela 5.7 pode-se estimar a Equação 5.2 que representa o modelo quadrático.

$$C_{\text{glicose BNP}} \text{ (g/g biomassa bruta seca)} = 0,2217 + 0,003277t - 0,01177t^2 - 0,006320T^2 + 0,003335C - 0,005029C^2 + 0,006750tT + 0,005250tC \quad 5.2$$

Tabela 5.7: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,222	0,00202	109,6	0,000083
(1) Tempo (°C) (L)	0,00328	0,000951	3,45	0,0748
Tempo (°C) (Q)	-0,0118	0,00105	-11,2	0,00782
(2) Temperatura (°C) (Q)	-0,00632	0,00105	-6,01	0,0266
(3) Conc. de cal (g/g) (L)	0,00334	0,000950	3,51	0,0725
Conc. de cal (g/g) (Q)	-0,00503	0,00105	-4,81	0,0406
1*2 (L)	0,00675	0,00124	5,44	0,0322
1*3 (L)	0,00525	0,00124	4,23	0,0516

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 5.8.

A validade do modelo pode ser verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.8. O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 10,52 que é maior que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{7,9} = 2,50$), concluindo assim que a equação do modelo quadrático é significativa a 90%. O modelo estudado não apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 3,22 que é menor que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{7,2} = 9,35$).

As superfícies de resposta para o modelo completo da análise da concentração de glicose liberada após o processo de hidrólise, segundo o planejamento composto central podem ser visualizadas nas Figuras 5.6, 5.7 e 5.8.

Tabela 5.8: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para a concentração glicose liberada após hidrólise do BNP pré-tratado com Ca(OH)_2 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	0,00254	7	0,000363	10,52 ¹
Resíduos (r)	0,000311	9	0,000035	3,22 ²
Falta de ajuste (faj)	0,000286	7	0,000041	
Erro puro (ep)	0,000025	2	0,000013	
Total (T)	0,00285	16		
% de variação explicada (R^2)	89,11			
% máxima de variação explicável	99,11			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{7,9} = 2,50$ no nível de 90% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{7,2} = 9,35$ no nível de 90% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

• Superfície de Resposta para Otimização do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2 – concentração de Cal

A Figura 5.6 apresenta a superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do bagaço não peneirado em função do tempo e da temperatura.

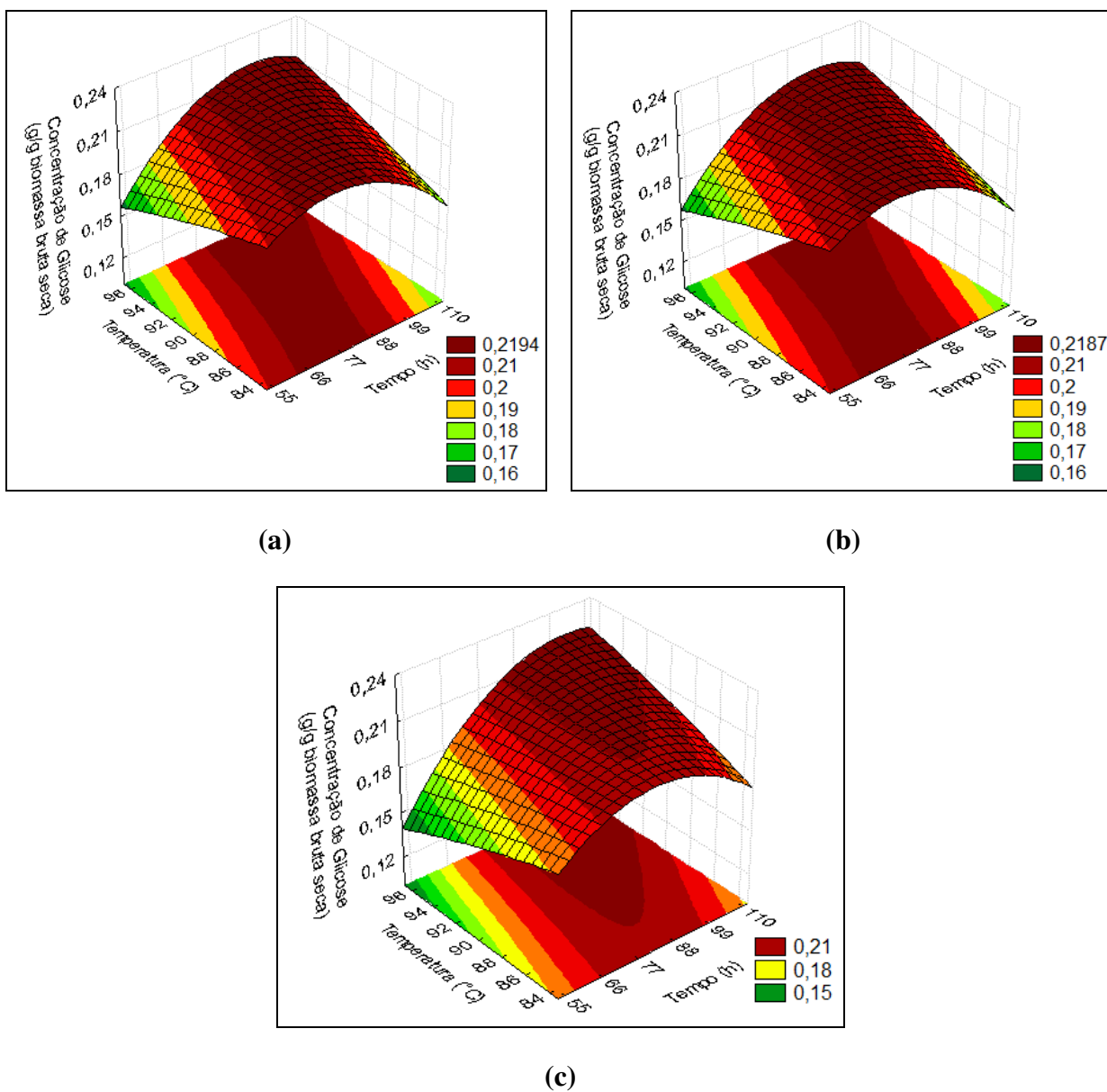


Figura 5.6: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da temperatura mantendo a concentração de cal no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).

Nesta análise variou-se a concentração de cal nos pontos estudados no planejamento composto central.

Ao analisarmos as superfícies de resposta da Figura 5.6 podemos perceber uma ampla faixa de condições reacionais para maximizar o rendimento de glicose. De uma forma geral, o aumento da concentração de cal (Figura 5.6 a-b-c) proporciona rendimentos ligeiramente maiores, além de mover as condições ótimas de pré-tratamento mais para a extremidade da curva (maiores tempos e maiores temperaturas).

• Superfície de Resposta para Otimização do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2 – Temperatura

Quando a temperatura é variada durante a análise estatística no ponto mínimo, central e máximo estudado, as superfícies de resposta podem ser analisadas através da Figura 5.7.

Na Figura 5.7 observa-se que as maiores concentrações de glicose são obtidas quando se trabalha em condições intermediárias de pré-tratamento. O mesmo fato observado na Figura 5.6 se repete, sendo que concentrações ligeiramente maiores são obtidas quando se aumenta a temperatura de pré-tratamento.

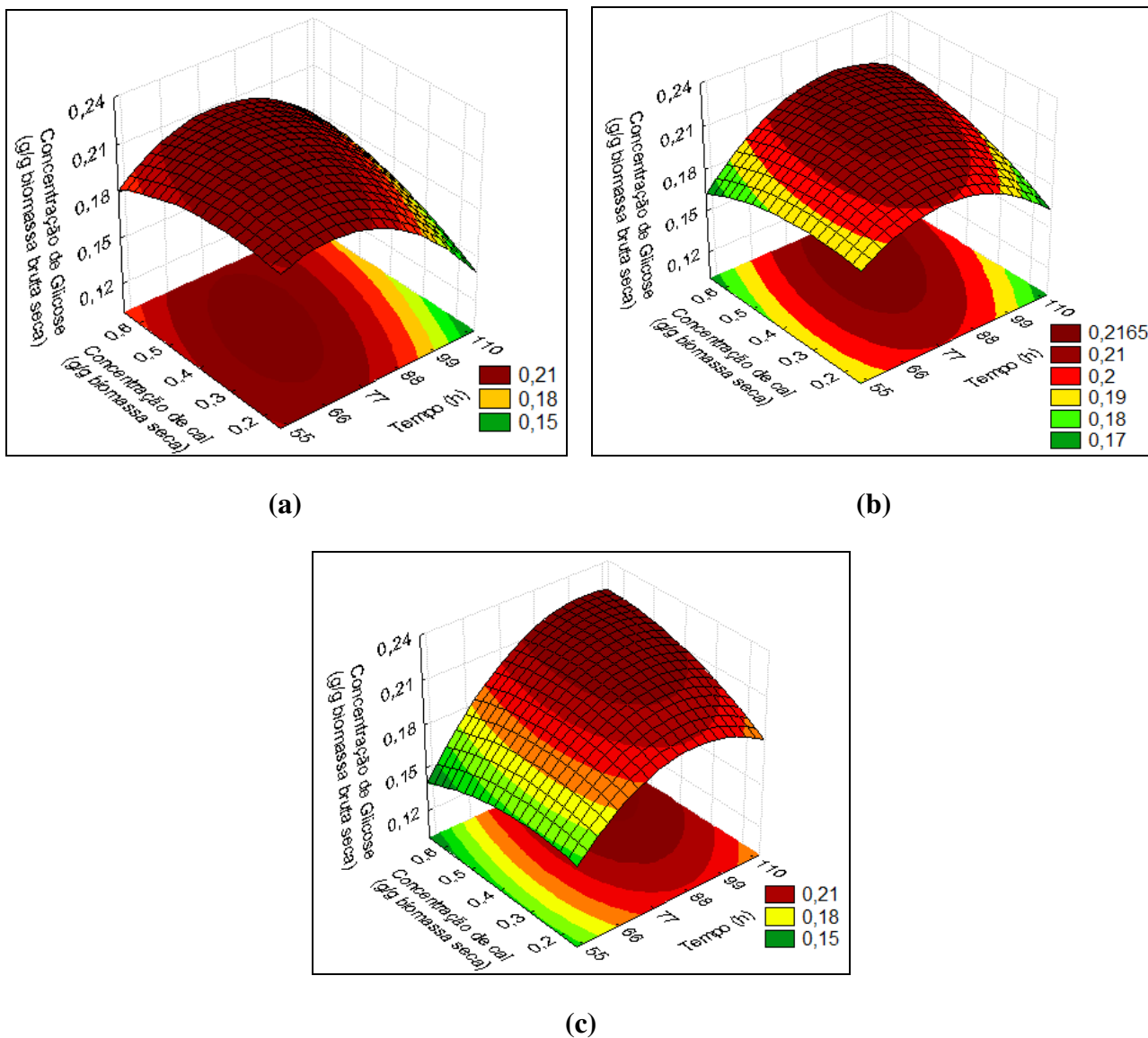


Figura 5.7: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função do tempo e da concentração de cal mantendo a temperatura no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).

• Superfície de Resposta para Otimização do Pré-Tratamento com Ca(OH)_2 – Tempo

Quando a variável tempo é analisada através do software STATISTICA, pode-se observar o mesmo desempenho das outras curvas, condições intermediárias de pré-tratamento levam a altos rendimentos de glicose após hidrólise enzimática. Estes resultados são apresentados na Figura 5.8.

O modelo quadrático mostrou-se estatisticamente significativo, além de descrever muito bem os dados experimentais. Assim, para o cálculo das condições ótimas, foi utilizada a Equação 5.2 com a finalidade de encontrar os valores reais de cada uma das variáveis de pré-tratamento visando à maximização a concentração de glicose liberada.

Derivando a Equação 5.2, em função de cada uma das variáveis, temos:

$$\frac{dC_{\text{glicose BNP}}}{dt} = 0,003277 - 2 \times 0,01177t + 0,006750T + 0,005250C$$

$$\frac{dC_{\text{glicose BNP}}}{dT} = -2 \times 0,006320T + 0,006750t$$

$$\frac{dC_{\text{glicose BNP}}}{dC_{\text{cal}}} = 0,003335 - 2 \times 0,005029C + 0,005250t$$

onde t (tempo), T (temperatura) e C (concentração de cal) apresentam valores codificados.

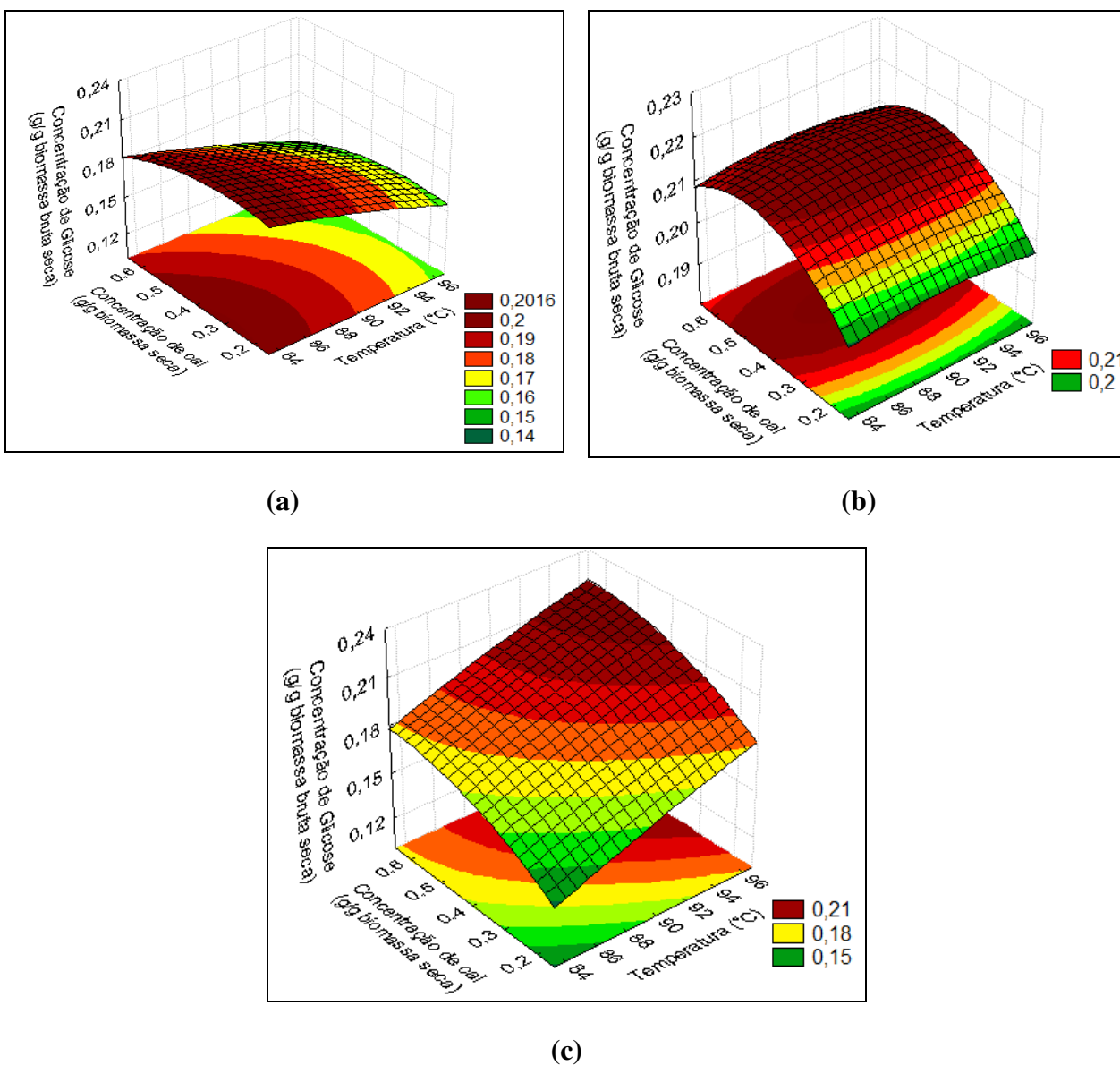


Figura 5.8: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise do BNP em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo (-1,41) (a) no ponto central (b) e no ponto máximo (+1,41) (c).

Como a derivada no ponto máximo é igual a zero temos o seguinte sistema de equações:

$$\begin{cases} 0,003277 - 0,02354t + 0,006750T + 0,005250C = 0 \\ -0,01264T + 0,006750t = 0 \\ 0,003335 - 0,01006C + 0,005250t = 0 \end{cases}$$

Resolvendo o sistema é possível chegar aos valores codificados para cada variável do processo e assim obter os valores ótimos para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio após decodificação. A Tabela 5.9 mostra os valores codificados e decodificados para cada uma das variáveis do processo.

Tabela 5.9: Valores codificados e decodificados para as variáveis do pré-tratamento com Ca(OH)_2 .

Variáveis	Valores codificados	Valores decodificados
Tempo (h)	0,292	87,6
Temperatura (°C)	0,156	90,6
Concentração de cal (g/g)	0,484	0,47

Pela Tabela 5.9 observa-se que as condições ótimas de pré-tratamento são de 87,6 h, 90,6°C e 0,47 g de cal/g biomassa bruta seca.

Estudos de otimização do pré-tratamento com hidróxido de cálcio realizado por GARZÓN FUENTES (2009), trabalhando com o bagaço de cana-de-açúcar com uma composição química diferente, proveniente de colheita crua e mecanizada, moído e com granulometria menor que 0,5 mm, mostraram através de modelos estatísticos que o valor das condições ótimas de pré-tratamento foi de 0,4 g de cal/g biomassa bruta a uma temperatura de 90°C durante um tempo de 90 h.

Comparando com os dados expostos na Tabela 5.9, obtidos através do modelo estatístico, observa-se uma proximidade dos valores das variáveis. Este resultado é de suma importância, uma vez que comprova que para uma mudança de material, devido à mudança de safra e composição química, as condições otimizadas da etapa de pré-tratamento não se alteram.

Os valores ótimos das variáveis foram arredondados para facilitar a execução dos experimentos, sendo assim realizados em 90 h, 90°C e 0,47 g de cal/g biomassa bruta seca.

5.4.2.2. Análise das Condições Ótimas do Pré-Tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Após selecionar o tempo de reação de 90 h, temperatura de 90°C e concentração de cal de 0,47 g/g biomassa bruta seca como as condições ótimas de pré-tratamento, realizaram-se ensaios em triplicata para a obtenção da concentração final dos açúcares e validar os resultados obtidos usando o modelo estatístico da Equação 5.2.

Para a liberação e quantificação dos açúcares, efetuou-se a hidrólise com as condições reacionais descritas na seção 4.3.2 e a quantificação realizada segundo as condições descritas na seção 3.3.4.3.

A Figura 5.9 mostra o perfil de hidrólise para o ponto ótimo do pré-tratamento com hidróxido de cálcio para o bagaço não peneirado.

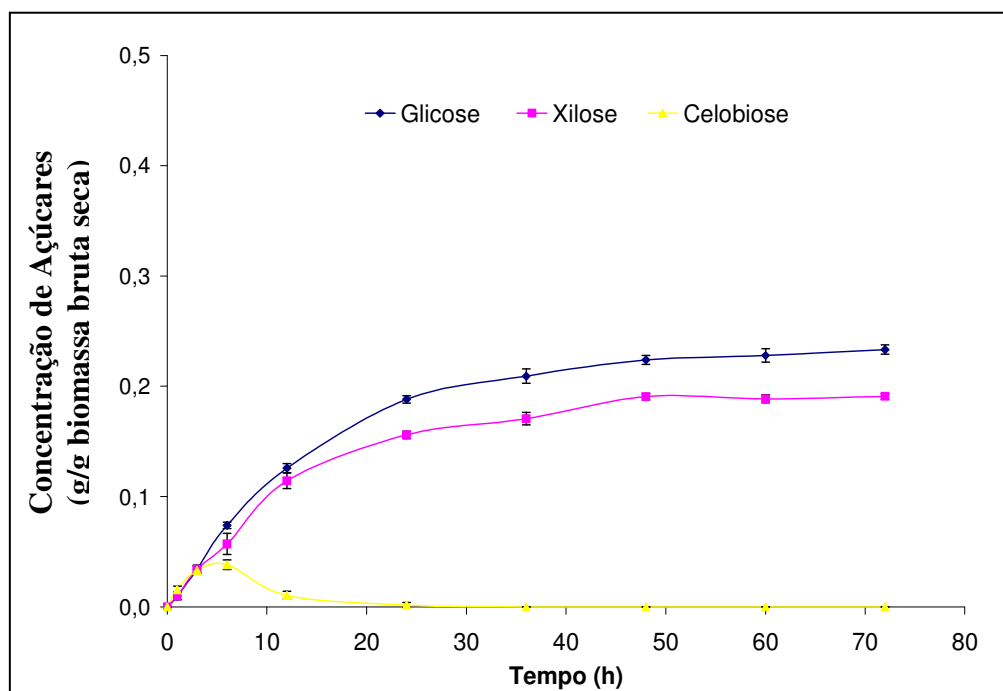


Figura 5.9: Perfil de hidrólise nas condições ótimas de pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Nota-se analisando a Figura 5.9 altos rendimentos de glicose liberados no meio reacional, existindo também uma quantidade considerável de xilose e sem acúmulo de celobiose no meio reacional. Os resultados indicam que 0,233 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,188 g/g biomassa bruta seca de xilose foram liberadas nas condições ótimas. O rendimento de glicose no ponto ótimo foi de 51,8%. A Equação 5.2 prevê uma concentração de 0,223 g/g biomassa bruta seca de glicose nas condições ótimas, o que corresponde a um erro de apenas 4,3%, validando então o modelo obtido.

A Figura 5.10 mostra a aparência e as massas do bagaço não peneirado antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após a hidrólise nas condições ótimas.



Figura 5.10: Amostras do bagaço antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após hidrólise de 1,0 g nas condições ótimas do pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

5.4.3. Otimização do Pré-Tratamento com H_2O_2 Alcalino

A otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino utilizando o bagaço não peneirado foi descrito por RABELO (2007). Para a otimização, a variável tempo foi

excluída neste novo estudo, uma vez que não se mostrou estatisticamente significativa para os ensaios lineares.

A Tabela 5.10 apresenta os rendimentos em glicose e xilose obtidos após hidrólise do bagaço não peneirado em cada um dos ensaios do planejamento composto central. Além disso, são apresentados os valores do rendimento global de glicose, calculados como descrito no *apêndice XI*, e a deslignificação para cada um dos ensaios. Foram marcados em negrito os maiores rendimentos obtidos e em vermelho os menores rendimentos. Nota-se que o maior rendimento em glicose corresponde à maior porcentagem de deslignificação e o menor rendimento em glicose à menor porcentagem de deslignificação, indicando que a deslignificação é um fator importante para aumento do rendimento para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Analisando os resultados dispostos na Tabela 5.10 e comparando com os resultados obtidos para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (Tabela 5.5 e Figura 5.5), nota-se que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio levou a maiores concentrações de glicose, proporcionando assim maiores rendimentos.

Análises posteriores foram realizadas no trabalho de RABELO (2007), chegando-se às condições ótimas do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino: tempo de reação de 1 h, temperatura de 25°C e concentração de peróxido de 7,36%. Os resultados mostraram que 0,380 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,158 g/g biomassa bruta seca de xilose foram liberadas nas condições ótimas. O rendimento global de glicose no ponto ótimo foi de 83,4%.

A Figura 5.11 mostra a aparência e as massas do bagaço não peneirado antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após a hidrólise de 1,0 g, nas condições ótimas.

Tabela 5.10: Matriz de planejamento com os resultados da concentração dos carboidratos, rendimento global de glicose e deslignificação para cada um dos ensaios do planejamento composto central para o pré-tratamento com H₂O₂ alcalino (RABELO, 2007).

Ensaio	Temperatura (°C)	[H ₂ O ₂] (% v/v)	Glicose (g/g)	Xilose (g/g)	Rendimento global da glicose (%)	Deslignificação (%)
1*	30	5	0,241	0,128	53,6	55,4
2*	30	9	0,282	0,114	62,7	69,8
3*	60	5	0,276	0,123	61,3	61,2
4*	60	9	0,280	0,096	62,2	66,3
5*	24	7	0,362	0,144	80,5	82,2
6*	66	7	0,295	0,105	65,6	72,9
7*	45	4,17	0,206	0,123	45,8	50,4
8*	45	9,83	0,269	0,115	59,8	57,8
9*	45	7	0,311	0,137	69,1	74,8
10*	45	7	0,338	0,147	75,1	76,7
11*	45	7	0,324	0,137	72,0	76,4

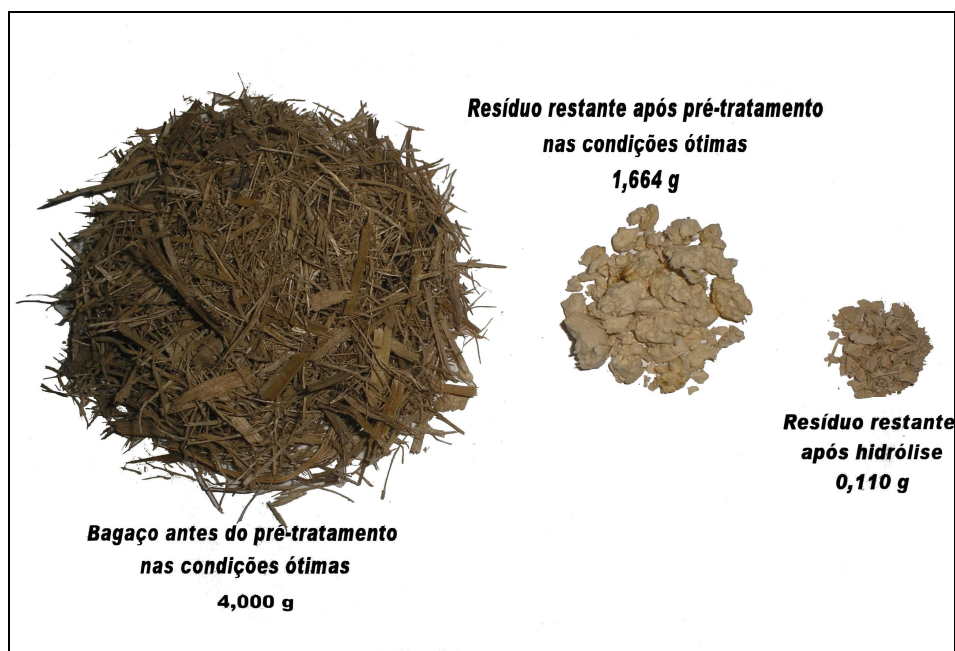


Figura 5.11: Amostras do bagaço antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após hidrólise nas condições ótimas do pré-tratamento com H_2O_2 alcalino (RABELO, 2007).

5.4.4. Análise da Composição Química do Bagaço no Processo Otimizado

Após o pré-tratamento do bagaço nas condições ótimas com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, análises da composição química foram realizadas em triplicata conforme as metodologias descritas no *apêndice III, IV e V*.

A Tabela 5.11 apresenta a composição química em termos de massa para o bagaço não peneirado antes e após cada pré-tratamento nas condições otimizadas.

Tabela 5.11: Composição química do bagaço não peneirado antes e após cada um dos pré-tratamentos nas condições ótimas.

Composição do BNP	Sem pré-tratamento (g)	Pré-tratado com Ca(OH)_2 (g)	Pré-tratado com H_2O_2 (g)
Massa	100,0	60,9	49,4
Cinza	$1,6 \pm 0,1$	-	-
Extrativos	$0,6 \pm 0,3$	-	-
Lignina total	$26,4 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,1$
Celulose	$40,5 \pm 1,6$	$40,3 \pm 0,2$	$39,9 \pm 0,7$
Hemicelulose	$24,5 \pm 0,4$	$12,4 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,5$
Total	$93,6 \pm 0,5$	$60,9 \pm 0,4$	$49,4 \pm 0,2$

Observa-se ao analisar a Tabela 5.11 que a massa de celulose restante ao final do processo de pré-tratamento é praticamente a mesma para os dois pré-tratamentos, não havendo perdas. O pré-tratamento com H_2O_2 alcalino leva a um material com menor quantidade de lignina e hemicelulose, o que está diretamente relacionado a este apresentar maiores rendimentos de glicose na etapa de hidrólise.

Em relação à lignina total, o bagaço pré-tratado com Ca(OH)_2 apresentou uma redução de 69,3% deste constituinte. Já o bagaço pré-tratado com H_2O_2 alcalino apresentou uma redução bem mais expressiva: 86,0% da lignina sendo solubilizada/degradada.

A mesma relação pode ser observada para a solubilização da hemicelulose com resultados consideravelmente maiores para o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino. Para o pré-tratamento com Ca(OH)_2 , 49,4% da hemicelulose foi solubilizada sendo uma solubilização de 76,3% observada para o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino.

5.5. Conclusões

Visando a otimização das condições reacionais do pré-tratamento com hidróxido de cálcio, um planejamento estatístico composto central foi realizado. Para esta etapa, somente o bagaço não peneirado foi considerado, já que sua utilização leva a um maior aproveitamento da matéria prima. Além disso, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio proporcionou rendimentos

de glicose similares para o bagaço não peneirado e peneirado, de 0,202 g/g biomassa bruta seca e 0,211 g/g biomassa bruta seca, respectivamente.

Os resultados deste novo planejamento mostraram que, na nova faixa estudada do pré-tratamento com hidróxido de cálcio, todas as variáveis foram significativas a 90% de confiança, sendo que as condições operacionais de 90 h, 90,0°C e 0,47 g/g de cal foram determinadas como as condições ótimas de pré-tratamento.

Segundo estudos realizados por RABELO (2007), as condições ótimas do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para uma máxima liberação de glicose pode ser obtida a 25°C, com concentração de H_2O_2 de 7,36% por 1 h em pH 11,5.

Os resultados da massa dos açúcares liberados após hidrólise enzimática a 50°C e pH 4,8 foram de 0,233 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,188 g/g biomassa bruta seca de xilose, para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio e 0,380 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,158 g/g biomassa bruta seca de xilose para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

O rendimento de glicose no ponto ótimo foi de 51,8% e 83,4% para os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

CAPÍTULO 6

ESTUDO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA ETAPA DE PRÉ-TRATAMENTO

Neste capítulo é apresentado um estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento do bagaço com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O intuito desta etapa é visualizar a carga máxima de sólidos possível para entrada no reator de pré-tratamento sem que haja um comprometimento no desenvolvimento da etapa de hidrólise enzimática e consequentemente no rendimento dos açúcares fermentescíveis.

6.1. Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar *in-natura* apresenta uma baixa densidade, sendo assim bastante difícil a alimentação de altas concentrações de sólidos nos reatores de pré-tratamento. Assim, estudos nesta área se mostram necessários, visando o desenvolvimento de equipamentos capazes de manter alimentação de forma regular a ambientes pressurizados (BAUDEL, 2006).

A concentração máxima de sólidos alimentada ao reator depende de alguns fatores, tais como o tipo de biomassa, morfologia, distribuição de formas e tamanho da partícula, densidade aparente, porosidade, tipo de pré-tratamento a ser realizado, finalidade da biomassa pré-tratada, dentre outros. A alta concentração de sólidos é importante para tornar o processo economicamente viável.

6.2. Materiais

6.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, foram utilizados os reagentes químicos listados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Reagentes químicos utilizados nos experimentos de aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido acético	Chemco	99,7
Ácido clorídrico	Merck	37
Hidróxido de cálcio	Merck	≥ 96
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95
Peróxido de hidrogênio	Ecibra	30

Além dos reagentes, as enzimas, previamente analisadas como apresentado nas seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, e os padrões cromatográficos, apresentados na Tabela 3.1 também foram utilizados.

6.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;

- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Difratorômetro de raios-X Rigaku Co. DMAXX 2200 (versão 2.2) com tubo de cobre;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS Tecnopon, com precisão de 0,01;
- Peneiras circulares
- Reator/fermentador encamisado modelo MA 502/1000 com agitador mecânico modelo MA – 259 da marca Marconi;
- Sistema para purificação de água Milli-Q® Ultrapure da marca Millipore.

6.3. Procedimento Experimental

6.3.1. Concentração de Sólidos e Condições Operacionais

O estudo do aumento da carga de sólidos durante a etapa de pré-tratamento foi realizado utilizando as condições ótimas para cada pré-tratamento, como determinadas no Capítulo 5.

Os valores da concentração de sólidos para cada um dos pré-tratamentos foram determinados através de testes visuais. Foi testada a máxima concentração de sólidos possível para cada pré-tratamento sem que houvesse prejuízos na homogeneização do material, provocando a sua aderência na parede do reator e prejudicando o processo. Além disso, o líquido reacional foi outro parâmetro de avaliação, já que este é fundamental para um contato efetivo do reagente com a biomassa.

Assim, para o hidróxido de cálcio foram realizados pré-tratamentos nas condições otimizadas (90 h, 90°C e 0,47 g de cal/g de biomassa seca) variando a concentração de sólidos de 4, 5, 6, 7 e 8% (m/v).

No pré-tratamento com hidróxido de cálcio foi observado que o pH do meio é um fator imprescindível para que haja uma boa deslignificação da biomassa. Assim, a proporção de cal/g

de biomassa foi mantida e não foi levada em consideração a diferente concentração do reagente no meio reacional e sim sua proporção em relação à biomassa.

Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, foi estudada uma variação na carga de sólidos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15% (m/v). Foram utilizadas as condições otimizadas do pré-tratamento, 7,36% (v/v) de peróxido de hidrogênio à 25°C por 1 h.

Segundo estudos realizados por GARCIA (2009), utilizando as condições otimizadas por RABELO (2007), para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, foi observado que dobrando a concentração de sólidos no reator e mantendo fixa a concentração de peróxido, não observou-se diferença significativa quanto à liberação de glicose após a etapa de hidrólise enzimática. Assim, foi possível aumentar a concentração de sólidos no reator mantendo a fixa a concentração de peróxido, obtendo como resultado praticamente o mesmo teor de glicose/g biomassa bruta seca.

Assim, para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a concentração do meio reacional foi mantida fixa (7,36% (v/v)), variando apenas a concentração de sólidos no reator.

6.3.2. Reações do Pré-Tratamento e Análise da Composição Química do Material

O pré-tratamento foi efetuado segundo a metodologia descrita na seção 4.3.1.1. Optou-se, para este estudo, pelo uso de reatores encamisados com agitador tipo turbina axial, visando uma melhor homogeneização do meio. A agitação foi mantida fixa para todos os ensaios, sendo de 300 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para cada um dos ensaios foi realizada uma análise da composição química do material visando uma comparação entre a concentração de sólidos e a eficiência do pré-tratamento, ou seja, composição química da biomassa ao final do processo. A análise foi realizada segundo metodologia descrita no *apêndice III, IV e V*. Para os ensaios do pré-tratamento com hidróxido de

cálcio, a quantidade de cal consumida foi determinada através do pH de neutralização. A metodologia para essa análise foi descrita no *apêndice X*.

6.3.3. Quantificação da Fração Líquida do Pré-tratamento

Após a etapa de pré-tratamento variando a concentração de sólidos, o líquido reacional foi separado para análise quanto ao teor de lignina solúvel e insolúvel, e para quantificação dos carboidratos solubilizados no meio reacional, todas em triplicata.

Para a determinação da concentração da lignina presente no licor, foi utilizado o método de precipitação da lignina proposto por KIM *et. al.* (1987). Ressalta-se que, segundo a literatura, este método para precipitar a lignina é o mais eficiente devido ao seu alto rendimento, cerca de 75 a 85% da massa de lignina presente no licor pode ser precipitada, e devido ao alto grau de pureza da lignina no produto precipitado (cerca de 1,5 a 2,5% em massa de impurezas).

O método proposto consiste de quatro etapas básicas: (i) preparação da amostra do licor através da separação da biomassa obtida após o pré-tratamento; (ii) precipitação da lignina através da acidificação do licor com solução de ácido sulfúrico 1,0 mol/L até atingir um pH próximo de 2; (iii) purificação da lignina obtida utilizando uma solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L; e (iv) secagem da lignina a temperatura ambiente. Sendo assim, após todas essas etapas foi possível determinar a massa de lignina insolúvel após cada um dos pré-tratamentos.

Para a determinação da lignina solúvel, amostras do líquido reacional foram coletadas, após a precipitação da lignina, e lidas espectrofotometricamente como descrito na metodologia do *apêndice V*, item 5.

Para a quantificação dos carboidratos presentes no licor de pré-tratamento, aproximadamente 5,0 mL do líquido reacional foi submetido à reação de hidrólise ácida após adição de ácido sulfúrico até pH 2. Essa etapa é necessária para garantir que todos os oligossacarídeos presentes no meio fossem hidrolisados a monossacarídeos e pudessem assim ser quantificados. A metodologia para a quantificação dos carboidratos por CLAE e todo o processo de hidrólise ácida foi descrito no *apêndice V*.

6.3.4. Hidrólise Enzimática e Quantificação do Hidrolisado

Para verificação das melhores condições de pré-tratamento, além da análise da composição química, foram realizadas hidrólises para todos os ensaios. A metodologia para a hidrólise foi apresentada na *seção 4.3.2*, mantendo fixas as condições operacionais, a concentração de sólidos e carga enzimática. Os carboidratos liberados após a hidrólise enzimática foram quantificados como descritos na *seção 4.3.2.1*.

6.3.5. Determinação do Índice de Cristalinidade (CrI)

Sabe-se que a composição química de uma biomassa não é o único fator que afeta a hidrólise enzimática, já que estudos mostram que a digestibilidade de α -celulose pura é menor do que a da palha de milho pré-tratada (KIM, 2004).

Propriedades físicas e a microestrutura de celulose estão entre os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática. O índice de cristalinidade é considerado como a propriedade mais importante dentre todos os fatores.

Neste estudo, o índice de cristalinidade da celulose foi determinado para cada um dos ensaios e medida por difração de raios X operando a 40 kV e 200 mA. Este equipamento utiliza a radiação eletromagnética para determinar os espaços interplanares e a estrutura cristalina do material. Os substratos celulósicos apresentam um pico intenso a $22,6^\circ$, pico este que representa a estrutura cristalina do material.

Os espectros de difração foram tomados pelo método θ - 2θ , e realizados no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) – FEQ/UNICAMP. Foram realizadas duplicatas das amostras, escaneadas a $1^\circ/\text{min}$ para $2\theta = 10$ - 50° , com um tamanho de passo de $0,05^\circ$. O conteúdo de água retida na amostra foi caracterizado por espalhamento de raios-X, que tem um máximo em $2\theta = 28^\circ$.

O índice de cristalinidade foi calculado utilizando a Equação 6.1, empregando para isso as intensidades de difração da estrutura cristalina (plano 002, $2\theta \approx 22,5^\circ$) e da fração amorfa

(plano am, $2\theta=18,7^\circ$). O CrI foi então determinado com a porcentagem de material cristalino e amorfa presente na biomassa, como é mostrado na Figura 6.1.

$$\%CrI = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad 6.1$$

Onde:

I_{002} : é a intensidade de difração da parte cristalina a uma posição de 002, aproximadamente $2\theta = 22,5^\circ$.

I_{am} : é a intensidade de difração da estrutura amorfa a $2\theta = 18,7^\circ$.

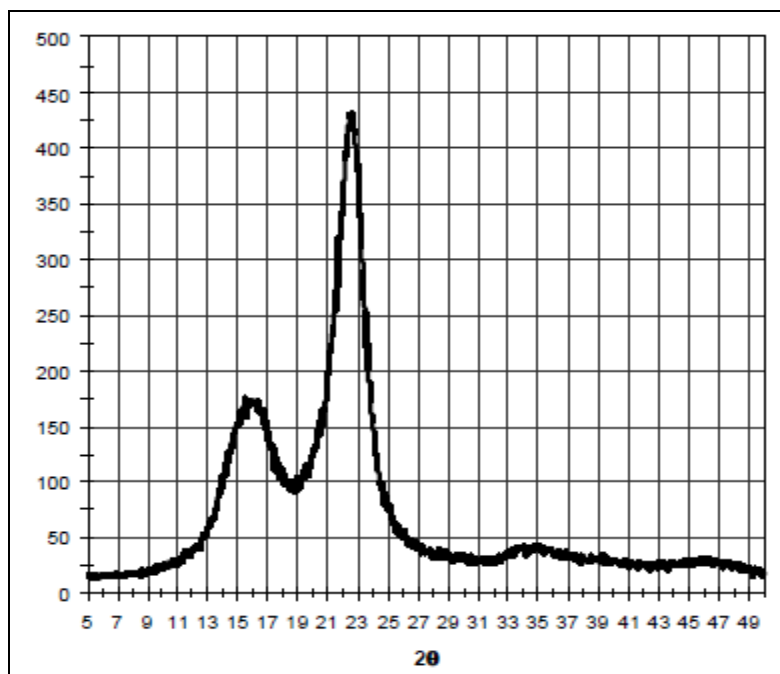


Figura 6.1: Difratoograma DRX de uma amostra de madeira (SEGAL *et al.*, 1959).

6.4. Resultados e Discussões

6.4.1. Análise da Composição Química

Os resultados das análises da composição química do bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, variando a concentração de sólidos, estão dispostos nas Tabelas 6.2 e 6.3, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. Além disso, foi disposta nas Tabelas 6.3 e 6.4 a composição química do bagaço de cana não peneirado, sem pré-tratamento (BSP).

Analizando a Tabela 6.2 é possível observar que com o aumento da concentração de sólidos no reator ocorre uma diminuição da eficiência do processo de pré-tratamento em termo de retirada de lignina e hemicelulose. Observa-se ainda que não houve perdas significativas de celulose em nenhum dos ensaios. Os mesmos efeitos foram observados para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (Tabela 6.3).

Resultado semelhante foi observado por LU *et al.* (2009). Os autores realizaram uma análise estatística do pré-tratamento hidrotérmico catalisado por ácido sulfúrico da palha de canola estudando as variáveis concentração de ácido (0,5-2%, m/m), tempo reacional (5-20 min) e concentração de sólidos no reator (5-20%, m/m). Os resultados mostraram que mantendo fixa a concentração de reagente em 1%, e o tempo reacional em 10 min, o aumento da concentração de sólidos no reator levou a uma diminuição da eficiência da solubilização da lignina e hemicelulose. Foi observado um conteúdo de celulose no resíduo sólido de 62,8 g/100g biomassa seca para o reator com 5% (m/m) de sólidos, contra 56,9 g/100g biomassa para o resíduo do reator com 20% (m/m) de sólidos.

Tabela 6.2: Composição química da biomassa após pré-tratamento com Ca(OH)_2 variando a concentração de sólidos.

Concentração da biomassa	BSP	4%	5%	6%	7%	8%
Massa	100,0	59,0	63,6	64,2	65,4	68,5
Cinza	$3,8 \pm 0,1$	-	-	-	-	-
Extrativos	$2,3 \pm 0,1$	-	-	-	-	-
Lignina	$25,8 \pm 1,6$	$7,9 \pm 0,16$	$8,9 \pm 0,16$	$10,0 \pm 0,17$	$11,1 \pm 0,28$	$13,0 \pm 0,20$
Celulose	$39,6 \pm 0,9$	$39,0 \pm 0,14$	$39,6 \pm 0,43$	$39,2 \pm 0,18$	$39,3 \pm 0,10$	$39,4 \pm 0,39$
Hemicelulose	$23,9 \pm 0,3$	$12,0 \pm 0,12$	$14,4 \pm 0,11$	$15,1 \pm 0,25$	$15,6 \pm 0,43$	$16,1 \pm 0,34$
Total	$95,4 \pm 1,8$	$58,9 \pm 0,42$	$62,9 \pm 0,7$	$64,3 \pm 0,60$	$66,0 \pm 0,82$	$68,6 \pm 0,93$

Tabela 6.3: Composição química da biomassa após pré-tratamento com H_2O_2 alcalino variando a concentração de sólidos.

Concentração da biomassa	BSP	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	15%
Massa	100,0	45,6	47,4	48,9	53,6	55,9	56,6	57,2	62,3
Cinza	$3,8 \pm 0,1$	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrativos	$2,3 \pm 0,1$	-	-	-	-	-	-	-	-
Lignina	$25,8 \pm 1,6$	$3,4 \pm 0,05$	$4,7 \pm 0,05$	$5,1 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,12$	$6,0 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,01$	$6,7 \pm 0,13$	$8,8 \pm 0,06$
Celulose	$39,6 \pm 0,9$	$37,5 \pm 0,39$	$37,4 \pm 0,09$	$38,2 \pm 0,35$	$39,6 \pm 0,16$	$39,6 \pm 0,03$	$39,4 \pm 0,85$	$39,7 \pm 0,16$	$39,7 \pm 0,62$
Hemicelulose	$23,9 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,21$	$6,4 \pm 0,09$	$7,1 \pm 0,03$	$9,5 \pm 0,13$	$11,5 \pm 0,08$	$11,8 \pm 0,19$	$11,8 \pm 1,27$	$14,1 \pm 0,50$
Total	$95,4 \pm 1,8$	$46,3 \pm 0,65$	$48,5 \pm 0,23$	$50,4 \pm 0,39$	$54,8 \pm 0,41$	$57,2 \pm 0,16$	$57,5 \pm 1,05$	$58,2 \pm 1,56$	$62,6 \pm 1,18$

Em relação à concentração de sólidos, foi possível trabalhar com até 8% (m/v) de bagaço no pré-tratamento com hidróxido de cálcio e com até 15% (m/v), para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, sem que isso prejudicasse na homogeneização do material. Assim, nota-se que o pré-tratamento com peróxido possibilita uma maior concentração de sólidos no reator, que está diretamente relacionado com o tipo de reação ocorrida, promovendo um arraste do material, minimizando assim os problemas de agitação e aderência do material nas paredes do reator. Além disso, o tempo reacional e temperatura do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é bem menor que do hidróxido de cálcio, o que também pode ser considerado um ponto a favor em relação à diminuição do volume reacional.

Comparando as Tabelas 6.2 e 6.3 nota-se que a composição química do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio a uma concentração de 5% (m/v) de sólidos é bastante semelhante à composição química do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino a 15% de sólidos (m/v). Observa-se ainda que a perda de massa nos dois ensaios é bastante similar.

Ainda para estes ensaios, calculando a porcentagem de cada componente tem-se uma composição de 14,0 e 14,1% de lignina, 62,3 e 63,7% de celulose e 22,6 e 22,7% de hemicelulose, para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio, respectivamente.

Assim, nota-se uma clara vantagem do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino quanto ao processo de deslignificação e solubilização da hemicelulose.

6.4.2. Quantificação do Licor de Pré-tratamento

As Tabelas 6.4 e 6.5 apresentam o balanço de massa para o licor de pré-tratamento. A concentração de glicose, celobiose e 5-hidroximetilfurfural foram utilizadas na quantificação da celulose hidrolisada no meio. Já a concentração de xilose, arabinose, furfural e ácido acético, determinados também por cromatográfica, foram utilizadas para determinar a porcentagem mássica de hemicelulose solubilizada no licor de pré-tratamento.

A lignina solúvel e insolúvel, quantificadas por espectroscopia e pesagem, respectivamente, foram somadas e expressas como lignina total.

Analisando as Tabelas 6.4 e 6.5, nota-se que, para os dois pré-tratamentos, o balanço de massa não foi fechado. Isso pode ter ocorrido devido à formação de outros compostos após a degradação da lignina e hemicelulose, não sendo estes quantificados.

6.4.3. Digestibilidade da Biomassa

6.4.3.1. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado com Ca(OH)_2

Para cada um dos ensaios foi realizada a hidrólise enzimática visando à quantificação dos açúcares. As Figuras 6.2 e 6.3 mostram a concentração de glicose e xilose liberadas após hidrólise enzimática nas condições operacionais descritas na *seção 4.3.2*, após pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Não foi observado, em nenhum dos ensaios, o acúmulo de celobiose no reator.

Tabela 6.4: Composição química do licor de pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ variando a concentração de sólidos.

Concentração da biomassa	4%	5%	6%	7%	8%
Massa solubilizada (g)	41,0	36,4	35,8	34,6	31,5
Lignina	$17,1 \pm 0,62$	$17,3 \pm 0,24$	$16,5 \pm 1,55$	$16,5 \pm 0,13$	$13,2 \pm 2,71$
Celulose	$1,7 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,14$	$0,9 \pm 0,24$	$1,1 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,17$
Hemicelulose	$12,9 \pm 0,12$	$8,1 \pm 0,78$	$7,8 \pm 0,11$	$7,0 \pm 0,21$	$6,6 \pm 0,32$
Total	$31,6 \pm 0,75$	$27,1 \pm 1,15$	$25,2 \pm 1,90$	$24,6 \pm 0,36$	$20,7 \pm 3,2$

Tabela 6.5: Composição química do licor de pré-tratamento com H_2O_2 alcalino variando a concentração de sólidos.

Concentração da biomassa	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	15%
Massa solubilizada (g)	54,4	52,6	51,1	46,4	44,1	43,4	42,8	37,7
Lignina	$19,4 \pm 0,20$	$20,1 \pm 1,02$	$18,7 \pm 0,71$	$17,1 \pm 0,95$	$21,8 \pm 0,32$	$19,8 \pm 0,89$	$19,4 \pm 0,69$	$17,4 \pm 0,34$
Celulose	$1,1 \pm 0,41$	$1,2 \pm 0,47$	$1,4 \pm 0,49$	$0,4 \pm 0,72$	$0,45 \pm 0,91$	$0,14 \pm 1,48$	$0,1 \pm 0,57$	nd*
Hemicelulose	$17,5 \pm 0,12$	$16,9 \pm 0,41$	$16,8 \pm 0,62$	$13,7 \pm 0,06$	$11,4 \pm 0,09$	$12,1 \pm 0,32$	$10,4 \pm 0,42$	$8,4 \pm 0,74$
Total	$38,0 \pm 0,73$	$38,2 \pm 1,78$	$36,9 \pm 1,39$	$31,2 \pm 1,73$	$33,7 \pm 1,32$	$32,0 \pm 2,26$	$29,9 \pm 1,67$	$25,8 \pm 1,08$

*nd: não detectável

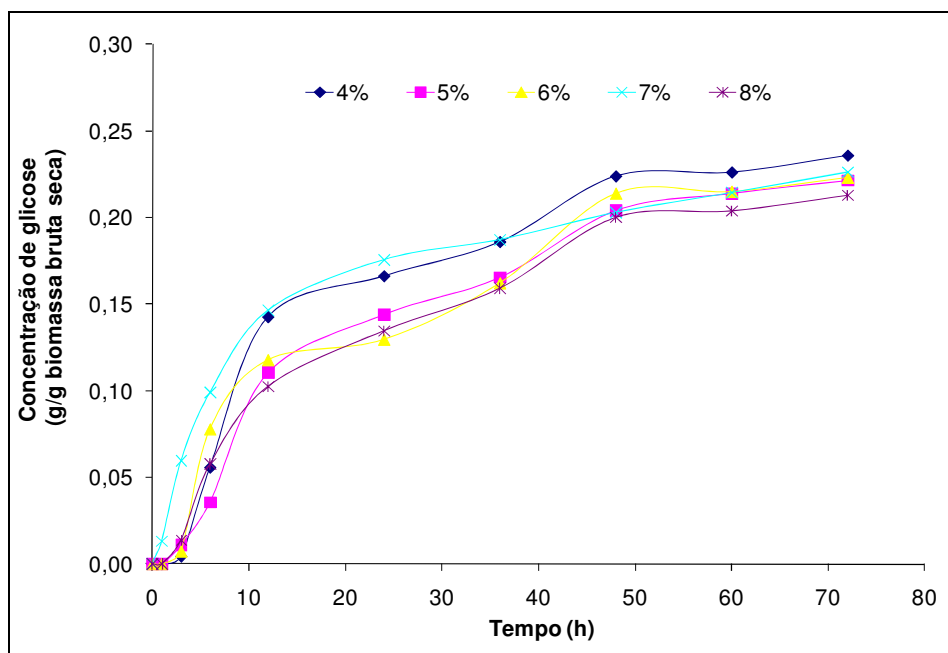


Figura 6.2: Concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

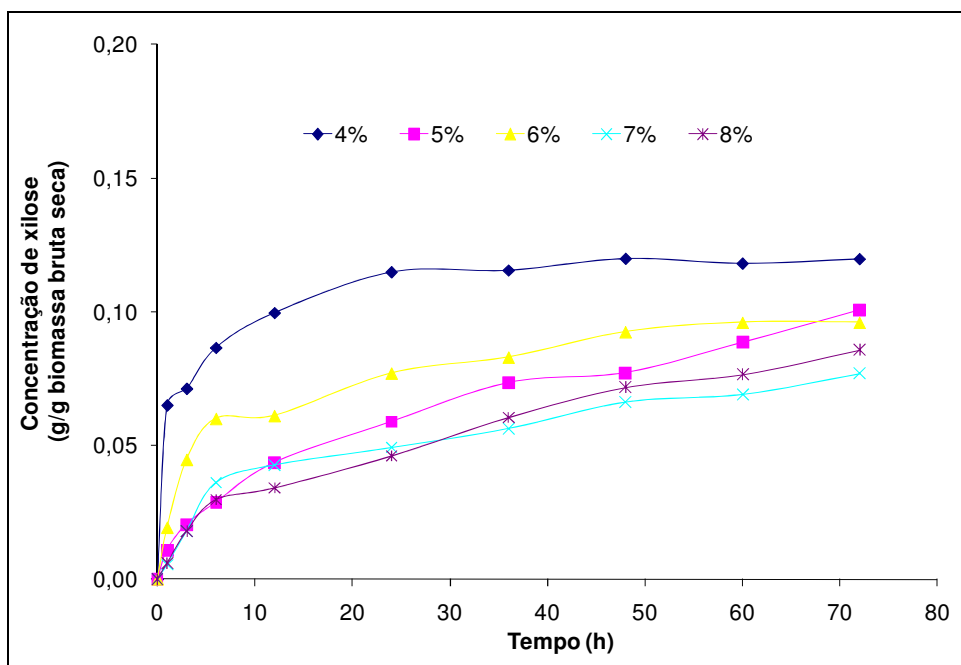


Figura 6.3: Concentração de xilose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

Analisando a Figura 6.2, nota-se, pelo perfil de hidrólise, que a concentração de glicose é semelhante em todos os ensaios, sendo que a maior liberação de glicose ocorreu para o bagaço pré-tratado com 4% (m/v) de sólidos e a menor com 8% (m/v) de sólidos, 0,236 g/g biomassa bruta seca e 0,213 g/g biomassa bruta seca, respectivamente.

Já na Figura 6.3, nota-se que a concentração de xilose no meio varia de uma forma mais expressiva que a concentração de glicose. À medida que aumenta a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, a concentração de xilose diminui. Este fato deve ser explicado pela melhor efetividade do pré-tratamento com menores concentrações de sólidos, o que proporciona um material com menor conteúdo de hemicelulose e lignina (Tabela 6.2), de forma a tornar mais fácil a hidrólise da hemicelulose.

A maior concentração de xilose foi obtida trabalhando com 4% de sólidos e a menor com 7% de sólidos, sendo de 0,120 g/g biomassa bruta seca e 0,077 g/g biomassa bruta seca, respectivamente.

A Figura 6.4 apresenta o rendimento global da celulose e hemicelulose, calculado conforme descrito no *apêndice XI*, para cada um dos ensaios.

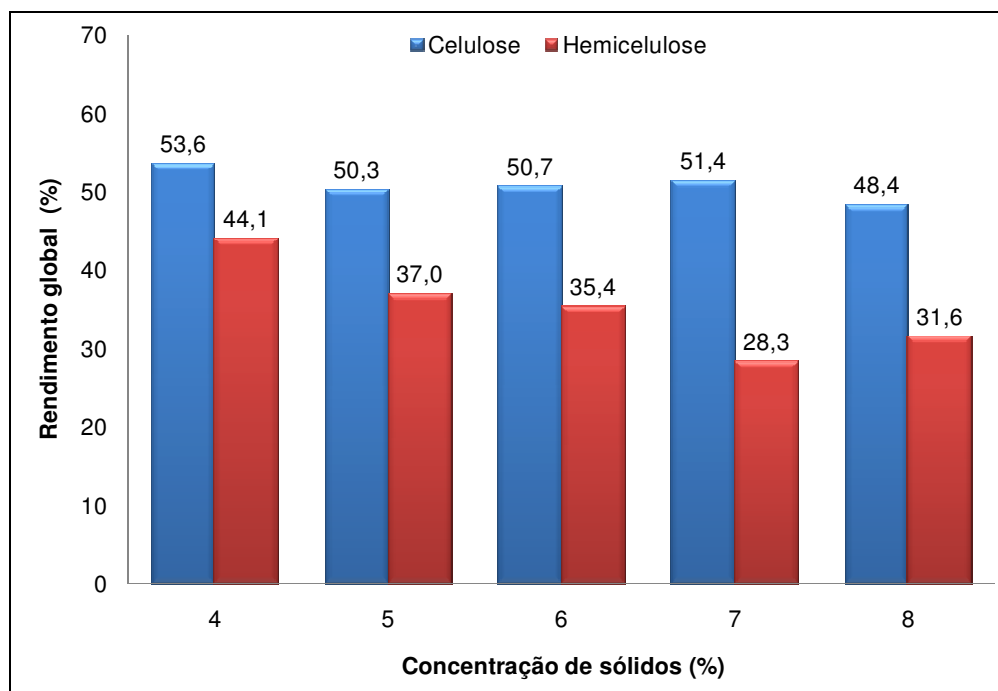


Figura 6.4: Rendimento global para cada ensaio variando a concentração de sólidos no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

O rendimento global da celulose e hemicelulose estão diretamente relacionados com a quantidade de celulose ou hemicelulose solubilizadas no pré-tratamento e hidrolisadas após hidrólise enzimática, em relação à quantidade inicial presente na biomassa bruta seca.

Através de análise da Figura 6.4 nota-se que o rendimento da celulose foi de aproximadamente 50% em todos os ensaios, ou seja, aproximadamente 50% da celulose presente no bagaço bruto foi solubilizada/hidrolisada. Neste caso nota-se que a variação na composição química do material (Tabela 6.2) não proporcionou diferenças significativas no rendimento.

Assim, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresenta uma vantagem em relação a possibilidade de aumentar a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento sem que haja prejuízos consideráveis no rendimento da glicose após hidrólise enzimática.

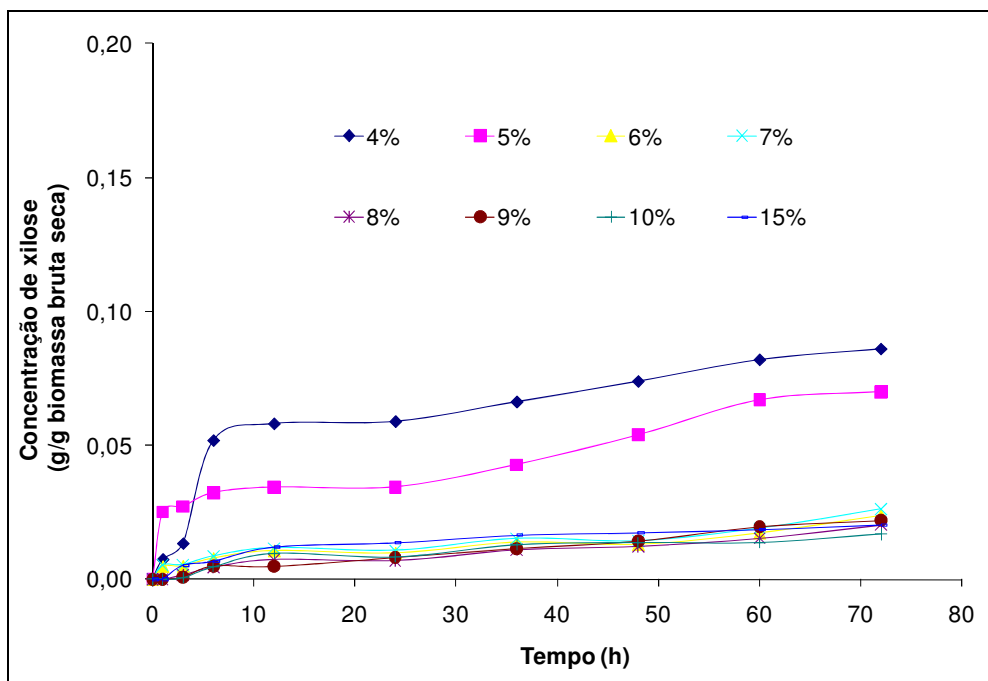


Figura 6.6: Concentração de xilose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

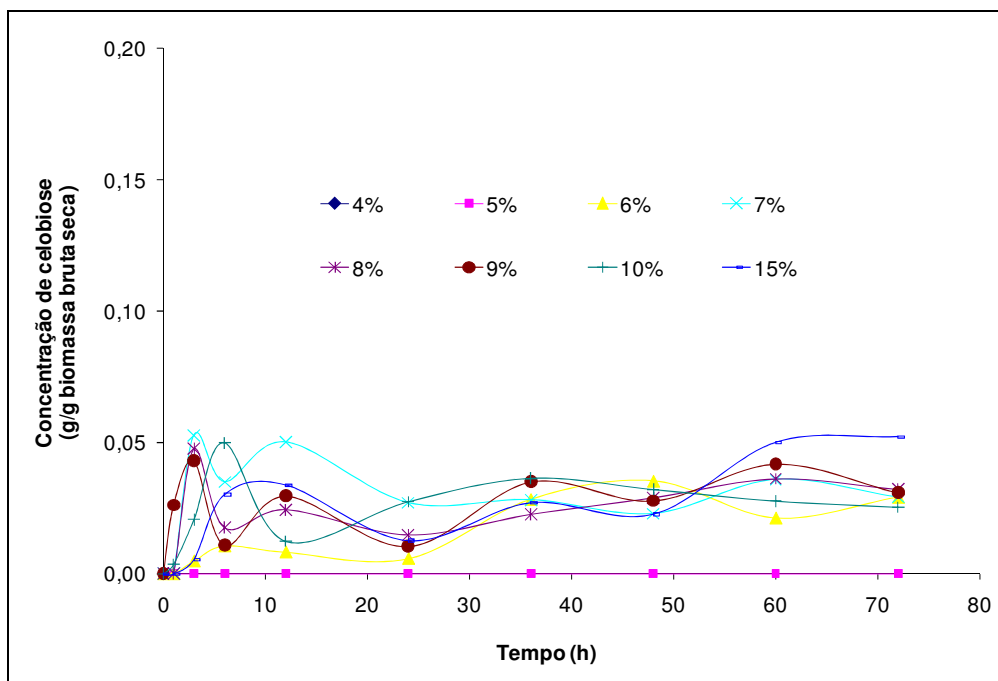


Figura 6.7: Concentração de celobiose liberada após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

Analisando a Figura 6.5, nota-se, pelo perfil de hidrólise, que a concentração de glicose foi maior para o ensaio com 4% (m/v) de sólidos, sendo obtidos 0,369 g/g biomassa bruta seca. Foi possível observar que para as concentrações de 4 e 5% (m/v) de sólidos, as concentrações de glicose foram ligeiramente maiores do que para os demais ensaios, sendo que os ensaios 6, 7, 8, 9, 10 e 15% apresentaram concentrações similares.

Os mesmos fatores foram observados para a liberação de xilose após a hidrólise enzimática (Figura 6.6). Quanto maior a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, menor a eficiência na liberação da xilose. A melhor concentração foi obtida para o ensaio com 4% (m/v) de sólidos, sendo hidrolisadas 0,086 g de xilose/g biomassa bruta seca.

No perfil de celobiose, como mostra na Figura 6.7, observa-se oscilações ao longo do tempo, sendo que em alguns casos houve acúmulo no reator ao final do processo de hidrólise. Esta quantidade de celobiose também foi considerada no cálculo do rendimento de celulose.

A Figura 6.8 apresenta o rendimento global da celulose e hemicelulose para cada um dos ensaios. Foi observado que para os ensaios com 6, 7 e 8, 9, 10 e 15 % (m/v) de sólidos o rendimento global de conversão da celulose é praticamente o mesmo. Foram obtidos rendimentos de 83,9% para o bagaço pré-tratado com 4% (m/v) de sólidos. Este resultado é similar ao obtido no processo de otimização do bagaço de cana com peróxido de hidrogênio alcalino, sendo obtido nesta ocasião rendimento de 83,4% (*seção 5.4.3*).

Comparando as Figuras 6.4 e 6.8 é possível observar que o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino leva a rendimentos de glicose maiores em todos os ensaios. Além disso, são obtidos menores rendimentos de xilose se comparado com o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, o que era de se esperar, visto que o pré-tratamento com hidróxido de cálcio resulta em biomassa com maior teor de hemicelulose.

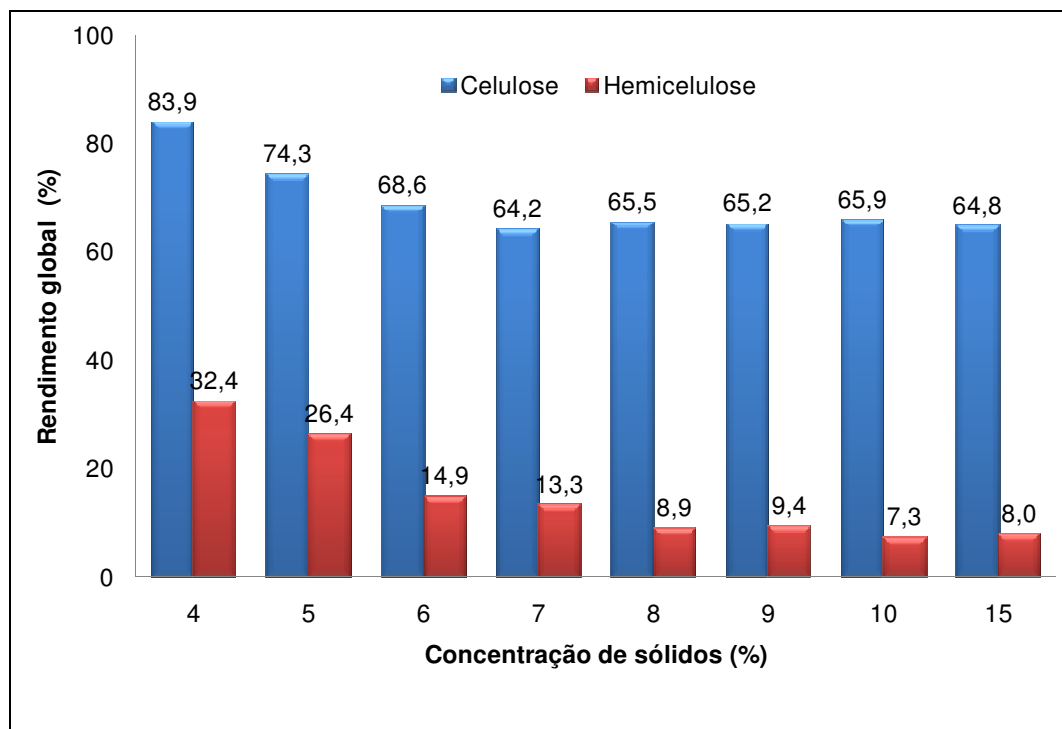


Figura 6.8: Rendimento global para cada ensaio variando a concentração de sólidos no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

6.4.4. Determinação do Índice de Cristalinidade (CrI)

O índice de cristalinidade do material antes e após cada ensaio foi determinado para cada pré-tratamento. As Figuras 6.9 e 6.10 mostram os difratogramas de intensidade dos picos em função do ângulo de Bragg 2θ para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

A partir destas curvas foram determinados os índices de cristalinidade conforme a Equação 6.1. Sabe-se que o índice de cristalinidade mede a quantidade relativa da celulose cristalina no sólido total. À medida que a proporção da fração amorfa presente na biomassa é solubilizada, observa-se um aumento do índice de cristalinidade da biomassa. Assim, para efetuar uma correção destes índices calculados, foi levado em consideração o rendimento da etapa de pré-tratamento, obtendo assim o novo índice de cristalinidade corrigido.

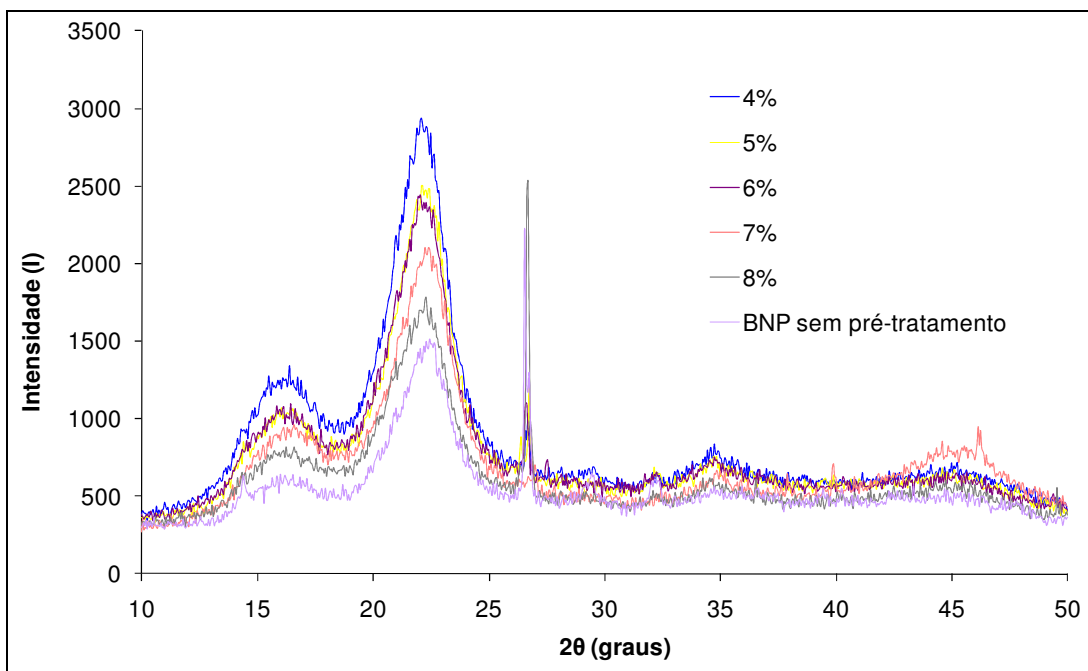


Figura 6.9: Difratograma para o bagaço bruto e pré-tratado com hidróxido de cálcio variando a concentração de sólidos.

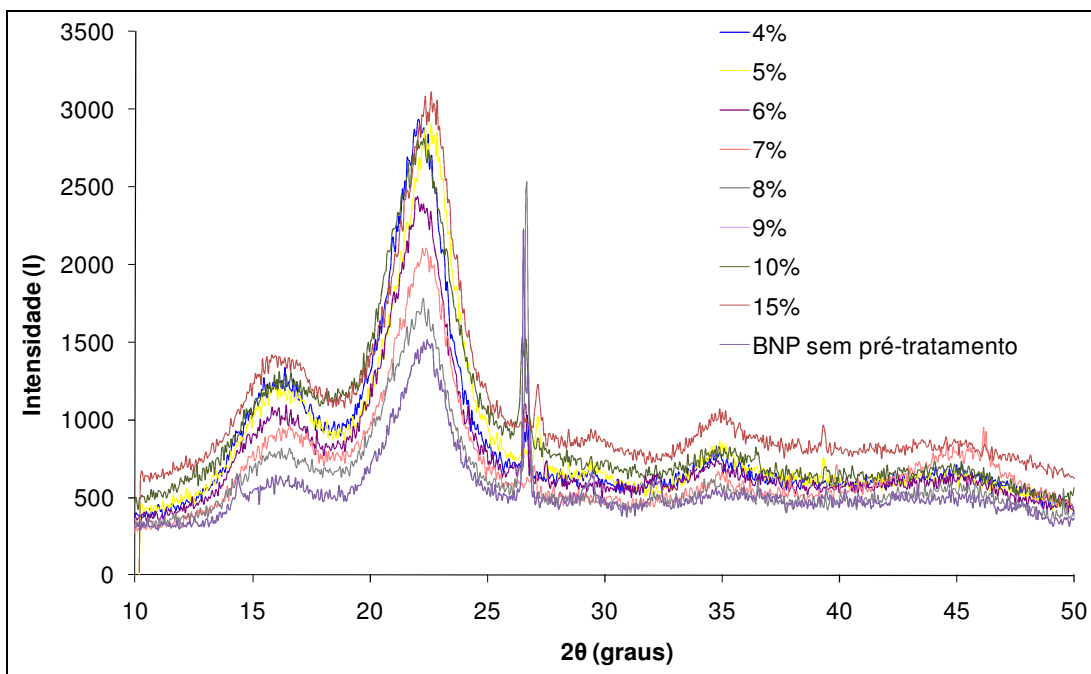


Figura 6.10: Difratograma para o bagaço bruto e pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino variando a concentração de sólidos.

As Tabelas 6.6 e 6.7 apresentam os valores do índice de cristalinidade antes e após a correção pelo rendimento da etapa de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 6.6: Índices de cristalinidade (CrI) para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Concentração de sólidos (% , m/v)	CrI calculado	Rendimento (%)	CrI corrigido pelo rendimento
4 (*BSP)	45,0	-	45,0
4	68,0	59,0	40,1
5	64,5	63,6	41,0
6	63,1	64,2	40,5
7	62,7	65,4	41,0
8	59,1	68,5	40,5

*BSP – Bagaço sem pré-tratamento.

Tabela 6.7: Índices de cristalinidade (CrI) para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Concentração de sólidos (% , m/v)	CrI calculado	Rendimento (%)	CrI corrigido pelo rendimento
4 (*BSP)	45,0	-	45,0
4	72,0	45,6	32,8
5	69,3	47,4	32,8
6	68,5	48,9	33,5
7	67,2	53,6	36,0
8	66,9	55,9	37,4
9	66,5	56,6	37,6
10	65,8	57,2	37,6
15	64,6	62,3	40,2

*BSP – Bagaço sem pré-tratamento.

Ao analisarmos a Tabela 6.6 observa-se, através do índice de cristalinidade corrigido, que a medida que aumenta a concentração de sólidos no reator de pré-tratamento, a cristalinidade

não é afetada de forma expressiva. Além disso, comparando estes índices calculados com o obtido para o bagaço sem pré-tratamento, nota-se que o pré-tratamento com hidróxido de cálcio não apresenta grande influência na diminuição da cristalinidade do material.

Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (Tabela 6.7) o índice de cristalinidade corrigido pelo rendimento aumenta a medida que aumenta a concentração de sólidos no reator. Além disso, observa-se uma maior influência do pré-tratamento na redução desta cristalinidade se comparado com o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Este fato pode ser confirmando ao compararmos o índice de cristalinidade do material obtido após pré-tratamento com peróxido utilizando uma concentração de sólidos de 15% (m/v) com os valores encontrados para a biomassa pré-tratada com hidróxido de cálcio a diferentes concentrações de sólidos (Tabela 6.6).

6.4.4.1. Mudança Composicional e Rendimento Global da Celulose

Para visualizar a relação entre o CrI corrigido, o rendimento global da celulose após hidrólise enzimática e a porcentagem remanescente de xilana e lignina, as Figuras 6.11 e 6.12 mostram esta análise comparativa para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

Analisando as Figuras 6.11 e 6.12, observa-se que a lignina e xilana remanescentes no material pré-tratado têm um importante papel na reação de hidrólise enzimática. Tanto a lignina quanto a hemicelulose são frações amorfas da biomassa e estão intimamente ligadas à cadeia de celulose. Assim, a remoção destes faz com que haja um aumento da área superficial e da porosidade da biomassa, facilitando assim o acesso da enzima à celulose, o que consequentemente aumenta rendimento da hidrólise. Na teoria, a taxa de hidrólise enzimática é proporcional à superfície.

Além disso, observa-se uma relação inversa entre o índice de cristalinidade corrigido e o rendimento global da hidrólise da celulose, com variações mais expressivas para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (Figura 6.12).

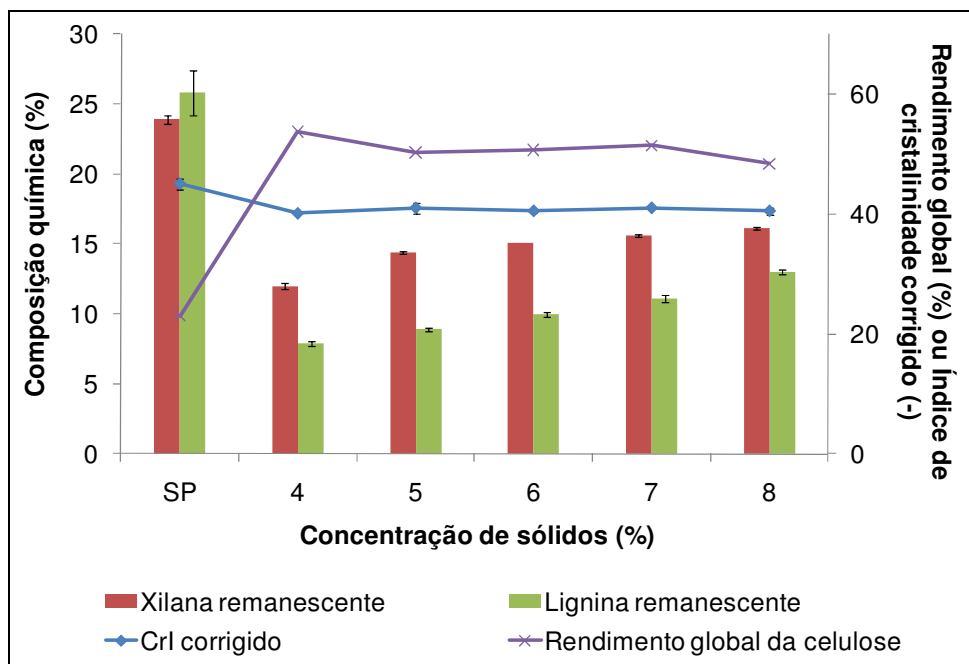


Figura 6.11: Efeito da concentração de sólidos na composição, no índice de cristalinidade corrigido e rendimento para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

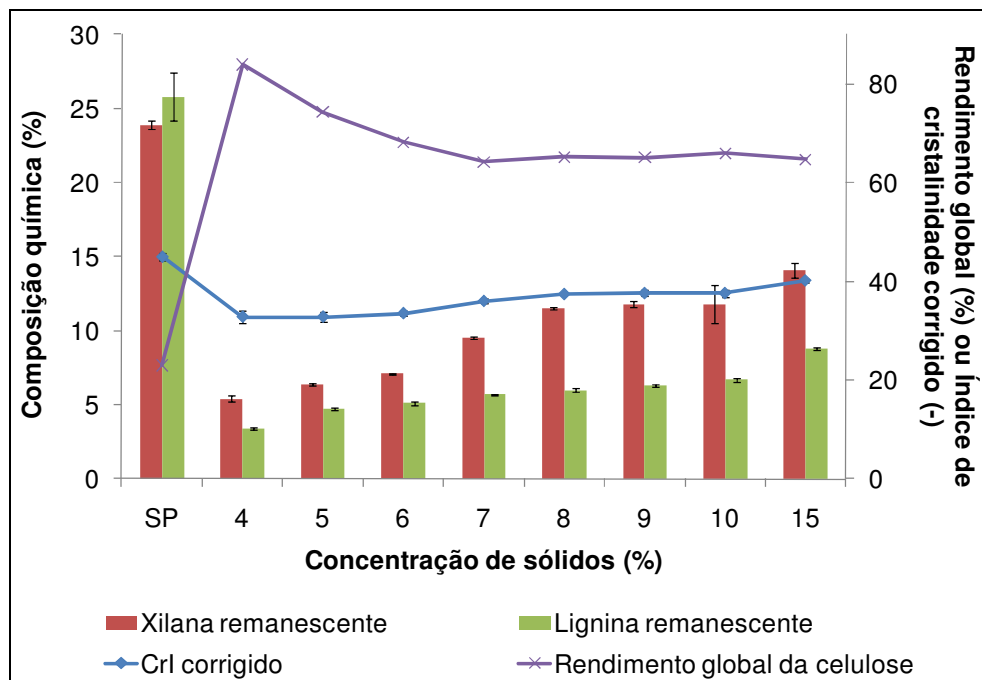


Figura 6.12: Efeito da concentração de sólidos na composição, no índice de cristalinidade corrigido e rendimento para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

6.5. Conclusões

Neste capítulo foi estudado o aumento da concentração de sólido durante a etapa de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino nas condições previamente otimizadas.

Foi possível observar que com o aumento da concentração de sólidos para os dois pré-tratamentos houve uma diminuição da eficiência do processo de pré-tratamento em relação à deslignificação e solubilização da hemicelulose. Em todos os ensaios não foram observadas perdas significativas de celulose.

Para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, a diferença em rendimento de glicose quando se aumenta a concentração de sólidos durante a etapa de pré-tratamento não é tão significativo quanto para o pré-tratamento com peróxido.

Em relação à concentração de sólidos, foi possível trabalhar com até 8% (m/v) de bagaço no pré-tratamento com hidróxido de cálcio e com até 15% (m/v), para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, sem que isso prejudicasse na homogeneização e desenvolvimento do processo.

Os melhores rendimentos de glicose foram obtidos a uma concentração de 4% de sólidos para os dois pré-tratamentos, sendo de 53,6% para o bagaço pré-tratado com cal e 83,9% para o peróxido, utilizando uma carga enzimática de 3,5 FPU/g bagaço seco pré-tratado e 1,0 CBU/g bagaço seco pré-tratado.

Na análise para determinação do índice de cristalinidade foi observado que o índice de cristalinidade corrigido pelo rendimento da etapa de pré-tratamento aumenta com o aumento da concentração de sólidos no reator, sendo fortemente influenciado pela composição química da biomassa. Foi observado que os índices são menores para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino do que para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Assim, para os próximos estudos, a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, para os dois agentes estudados foi mantida fixa em 4% (m/v) de sólidos, uma vez que esta concentração levou a uma maior deslignificação e solubilização da hemicelulose, além de maior rendimento na etapa de hidrólise enzimática.

CAPÍTULO 7

OTIMIZAÇÃO DA CARGA ENZIMÁTICA

Neste capítulo é apresentado um estudo da otimização da carga enzimática para a hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino nas condições previamente otimizadas. O intuito desta etapa foi determinar a carga enzimática mínima capaz de levar a um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. O efeito da carga enzimática no rendimento de açúcares fermentescíveis foi estudado através de análises utilizando o planejamento composto central (superfície de resposta) para determinar a quantidade ótima de celulase e β -glicosidase em cada um dos pré-tratamentos desenvolvidos.

7.1. Introdução

A sacarificação da celulose proveniente de materiais lignocelulósicos tem despertado grande interesse para a produção de etanol de segunda geração. No entanto, apesar de muitos estudos, as características do substrato que atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose não estão totalmente compreendidas. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (PALONEN *et al*, 2004).

Além disso, bioprocessos baseados na hidrólise enzimática requerem substratos produzidos com a qualidade adequada, que propicie melhores rendimentos do processo. A hidrólise da biomassa pré-tratada com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino é

afetada por características estruturais resultantes destes tratamentos. CHANG e HOLTZAPPLE (2000) relataram correlações entre a digestibilidade enzimática e três fatores estruturais: teor de lignina, cristalinidade e conteúdo de acetil. Os pesquisadores observaram que (i) uma extensa deslignificação da biomassa é suficiente para obtenção de alta digestibilidade, independentemente do teor de acetil e cristalinidade, (ii) o processo de deslignificação e desacetilação removem barreiras físicas à hidrólise enzimática, e (iii) a cristalinidade afeta significativamente as taxas de hidrólise na etapa inicial, mas apresenta um menor efeito no rendimento final dos açúcares. Estes resultados indicam que um processo de pré-tratamento eficaz deve remover todos os grupos acetil e reduzir o teor de lignina para cerca de 10% na biomassa pré-tratada.

Apesar de intensos estudos, vários fatores ainda impedem uma utilização em larga escala dos materiais lignocelulósicos para produção de combustível líquido. O principal obstáculo é a necessidade de altas concentrações de enzima, a fim de obter uma alta conversão de celulose em glicose, juntamente com o longo tempo de processo, devido à rápida diminuição da taxa de hidrólise (SHEEHAN e HIMMEL, 1999). Além disso, o processo de reciclagem da enzima é bastante difícil, uma vez que estas se adsorvem no material lignocelulósico residual.

A fim de tornar a hidrólise de celulose para produção de etanol economicamente viável é de suma importância identificar a carga enzimática necessária para aumentar a eficácia do processo. A hidrólise da celulose em glicose depende da sinergia de três enzimas do complexo celulolítico: β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglicanase (EC 3.2.1.91) e celobiase/ β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (TOLAN e FOODY, 1999). No entanto, o complexo celulolítico mais utilizado, de *Trichoderma reesei*, é pobre em celobiase e, portanto, restringe à conversão da celobiose a glicose, causando uma inibição pelo produto. Portanto, uma quantidade extra desta enzima pode ser necessária para melhorar o rendimento da hidrólise enzimática.

Paralelamente, estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (IMAI *et al.*, 2004).

7.2. Materiais

7.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de otimização da etapa de hidrólise enzimática foram utilizadas as enzimas celulase e β -glicosidase, previamente analisadas conforme apresentado nas seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, e padrões cromatográficos para quantificação dos açúcares liberados após hidrólise, como apresentados na Tabela 3.1.

Foi utilizado, como matéria prima, o bagaço pré-tratado nas condições otimizadas para cada agente, como descrito na seção 5.4.2.2 (hidróxido de cálcio) e 5.4.3 (peróxido de hidrogênio alcalino). Foi utilizada, em ambos os casos, uma concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento de 4% (m/v), como determinado anteriormente na seção 6.4.3.1, para pré-tratamento com hidróxido de cálcio e 6.4.3.2, para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

A Tabela 7.1 apresenta os reagentes utilizados nesta etapa.

Tabela 7.1: Reagentes utilizados nos experimentos de otimização da carga enzimática.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido cítrico monohidratado	Dinâmica	99,5
Ácido clorídrico	Merck	37
Azida de sódio	Vetec	99,0
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95

7.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515,

detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;

- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo MA-832 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS Tecnopon, com precisão de 0,01;
- Peneiras circulares;
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

7.3. Procedimento Experimental

7.3.1. Otimização da Hidrólise Enzimática

Para a otimização da etapa de hidrólise enzimática foi utilizada uma concentração de 3% (m/v) de bagaço pré-tratado em cada uma das condições otimizadas. Segundo estudos realizados por GARCIA (2009) e GARZÓN FUENTES (2009), uma concentração de 3% de sólidos é eficiente na liberação dos açúcares fermentescíveis sem que haja um grande comprometimento devido ao acúmulo de celobiose no meio reacional.

Ao material pré-tratado foi adicionado 100 mL de tampão citrato 0,05 mol/L com 0,07 g de azida de sódio. Nesta etapa optou-se por utilizar o tampão citrato para facilitar o controle do pH do meio e a azida foi utilizada como antibiótico, uma vez que, com o aumento da concentração de sólidos, a concentração de açúcar no meio reacional aumenta consideravelmente, o que poderia propiciar o crescimento de microrganismos fermentativos.

O meio reacional teve o pH ajustado para 4,8 e as condições de temperatura e agitação mantidas a 50°C e 150 rpm. A cada ensaio foram adicionadas diferentes concentrações de

celulase e β -glicosidase de acordo com o planejamento composto central 2^2 , com três pontos centrais, como mostrado na Tabela 7.2.

Tabela 7.2: Fatores codificados e valores reais para a otimização da hidrólise enzimática.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Celulase (FPU/g biomassa seca pré-tratada)	3,5	12,7	35	57,3	66,5
β-glicosidase (CBU/g biomassa seca pré-tratada)	0	7,3	25	42,7	50

Foi estipulado como valor mínimo para a celulase a quantidade de enzima utilizada nos estudos anteriores e para a β -glicosidase, a não adição desta enzima, uma vez que ela já está presente no complexo celulolítico comercial e objetiva-se avaliar a real importância de adicioná-la de fontes externas para o aumento da concentração dos açúcares fermentescíveis.

Alíquotas foram retiradas ao longo da reação e fervidas para a desnaturação das enzimas, sendo posteriormente submetidas à quantificação dos açúcares por CLAE, como descrito na *seção 4.3.2.1*.

7.4. Resultados e Discussões

7.4.1. Rendimentos da Hidrólise Enzimática

Na Tabela 7.3 é apresentada a matriz de planejamento com as respostas do rendimento da hidrólise enzimática para a glicose e xilose. Neste caso optou-se por utilizar o rendimento da hidrólise como variável de resposta e não o rendimento global do processo, uma vez que a etapa de pré-tratamento já se encontrava otimizada. Os cálculos foram realizados segundo equações descritas no *apêndice XI*. Os melhores resultados foram marcados em negrito.

Tabela 7.3: Matriz de planejamento apresentando os rendimentos de glicose e xilose após hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Ensaio	Celulase (FPU/g biomassa seca pré-tratada)	β -glicosidase (CBU/g biomassa seca pré-tratada)	Rendimento da hidrólise glicose (%)		Rendimento da hidrólise xilose (%)	
			Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio
1	12,7	7,3	85,0	100	88,7	99,1
2	12,7	42,7	85,3	98,3	89,0	85,5
3	57,3	7,3	86,8	97,3	89,7	86,1
4	57,3	42,7	86,8	95,4	89,1	64,5
5	3,5	25	70,3	100	82,3	36,6
6	66,5	25	88,7	92,3	89,7	49,9
7	35,0	0	84,0	88,5	89,7	63,0
8	35,0	50	84,8	92,9	89,5	60,9
9 (C)	35,0	25	85,9	98,3	89,4	48,7
10 (C)	35,0	25	85,8	97,9	89,6	48,5
11 (C)	35,0	25	86,1	98,5	89,9	47,7

Analizando a Tabela 7.3 pode-se notar que a maior produção de glicose para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio foi observada no ensaio 6, trabalhando com a maior carga enzimática estudada neste planejamento, 66,5 FPU/g biomassa seca pré-tratada e 25 CBU/g biomassa seca pré-tratada para celulase e β -glicosidase, respectivamente. Nota-se um rendimento de hidrólise de 88,7%.

Para a xilose, altos rendimentos foram obtidos em todos os ensaios, sendo mínima a diferença entre as concentrações, não se apresentando significativas.

Para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, foi possível observar 100,0% de rendimento de hidrólise para a glicose em dois ensaios, ambos com baixa carga enzimática de celulase e β -glicosidade (ensaios 1 e 5). Em relação ao rendimento de xilose, observa-se que a maior liberação também ocorreu para o ensaio 1, tendo sido praticamente toda a hemicelulose remanescente no material pré-tratado hidrolisada durante esta etapa, com rendimento de 99,1%.

Comparando os dois pré-tratamentos, observa-se que o peróxido de hidrogênio alcalino leva a maiores rendimentos de glicose utilizando menores cargas enzimáticas. Isso se deve ao fato do material apresentar uma composição química mais favorável, com menores teores de lignina e hemicelulose, o que acaba dificultando o processo de hidrólise no caso do pré-tratamento com hidróxido de cálcio, além disso, fatores como índice de cristalinidade, aumento da porosidade do material, dentre outros, devem estar relacionados.

Observa-se ainda na Tabela 7.3 que, comparando-se os ensaios 1 com 3, os ensaios 2 com 4 e os ensaios 5 com 6, pode-se concluir que, mantendo a concentração de β -glicosidase fixa e aumentando-se a concentração de celulase, o rendimento de glicose aumenta para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio e diminui para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. O comportamento no caso do pré-tratamento com hidróxido é esperado e similar ao reportado por ZHANG *et al.* (2010) para sabugo de milho pré-tratado com imersão em amônia aquosa. A biomassa pré-tratada com peróxido se comporta de forma completamente diferente e os resultados são similares aos obtidos por GARCIA (2009) usando bagaço com características diferentes e diferentes faixas de concentração enzimática.

Comparando os ensaios 1 com 2, os ensaios 3 com 4 e os ensaios 7 e 8 com os ensaios de ponto central, vemos que quando mantemos a concentração de celulase fixa e aumentamos a concentração de β -glicosidase, não se observa praticamente variação no rendimento de glicose para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Uma explicação possível para este fato é a alta afinidade que a lignina tem pela β -glicosidase (HUANG e PENNER, 2002). Grandes concentrações de β -glicosidase provavelmente levam a alta adsorção desta enzima pela lignina residual, o que acaba ocasionando em um recobrimento do material lignocelulósico, diminuindo os sítios ativos e impedindo o ataque da enzima a celulose. Para o pré-tratamento com peróxido vemos aumento do rendimento só na comparação entre o ensaio 7 (sem adição de β -glicosidase de outra fonte) e os ensaios de ponto central (25 CBU/g biomassa de β -glicosidase). Além desta concentração, o aumento da quantidade de β -glicosidase ocasiona diminuição do rendimento em glicose.

A Figura 7.1 mostra o rendimento global do processo para a celulose, considerando não somente a glicose liberada no meio, mas também a celobiose. Foi possível observar que, em todos os ensaios, o rendimento para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino é maior que do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. De uma forma geral, os hidrolisados do bagaço pré-tratado com peróxido apresentaram um maior acúmulo de celobiose no meio reacional, quando comparado com o mesmo ensaio para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

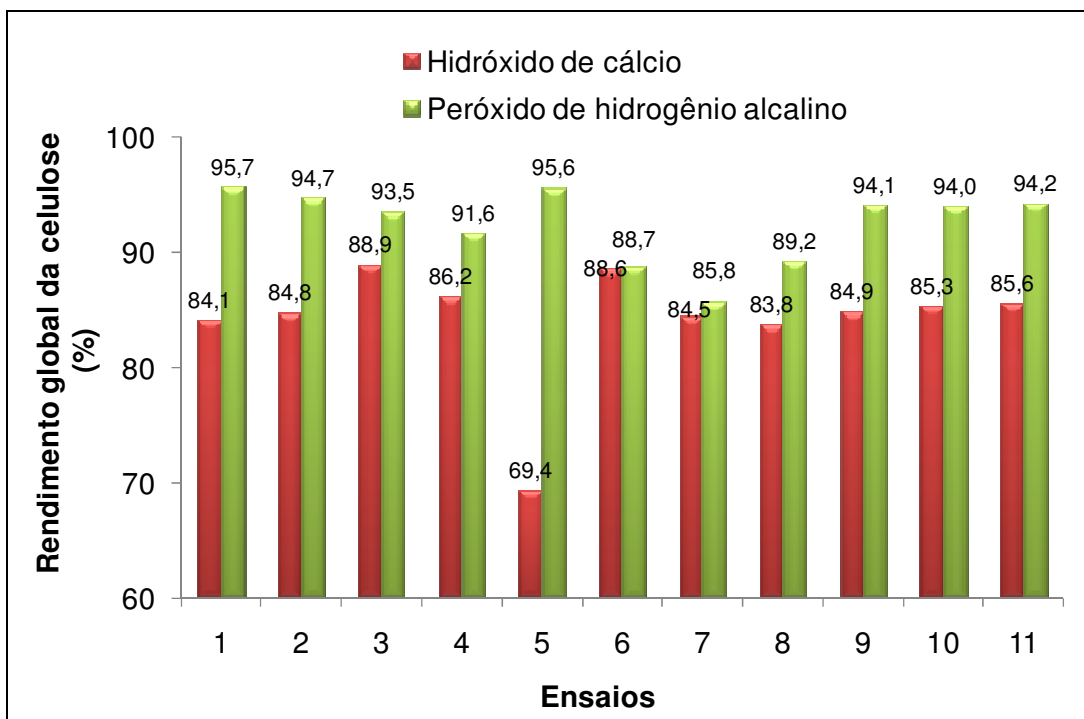
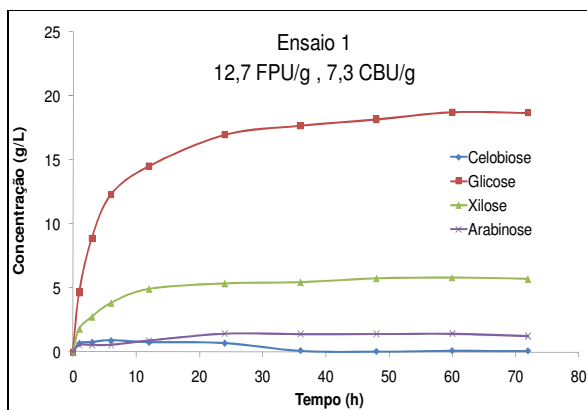


Figura 7.1: Rendimento global da celulose para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

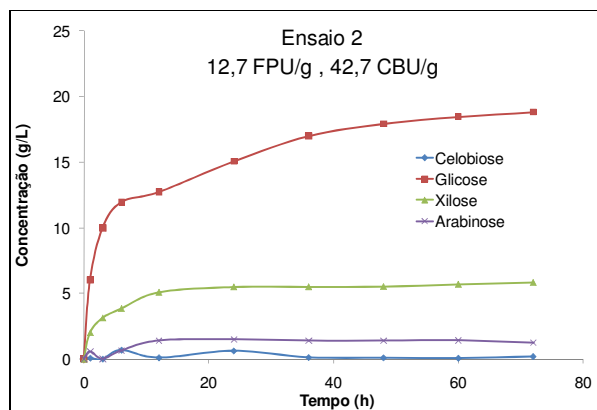
O maior rendimento global, no caso do pré-tratamento com hidróxido, foi obtido no ensaio 3, sendo que 88,9% da celulose presente no material bruto foram convertidas em glicose e celobiose após hidrólise enzimática. Já para o bagaço pré-tratado com peróxido, novamente os ensaios 1 e 5 apresentaram-se com os melhores rendimentos, 95,7 e 95,6%, respectivamente.

7.4.2. Análise Estatística do Rendimento de Hidrólise para a Glicose em Relação a Variação da Carga Enzimática para o Pré-Tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

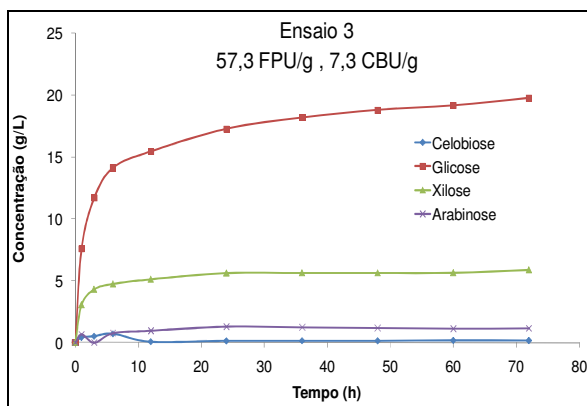
Para todos os ensaios, a concentração dos carboidratos liberadas em função do tempo de hidrólise, foram analisada. A Figura 7.2 (a-i) mostra estes perfis de hidrólise para todos os ensaios. A metodologia experimental para a quantificação dos açúcares foi descrita na *seção* 4.3.2.1.



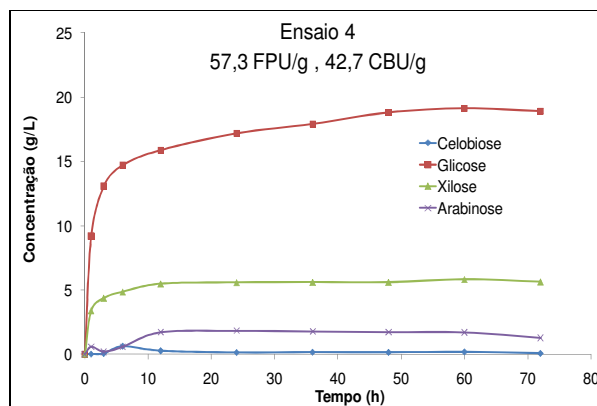
(a)



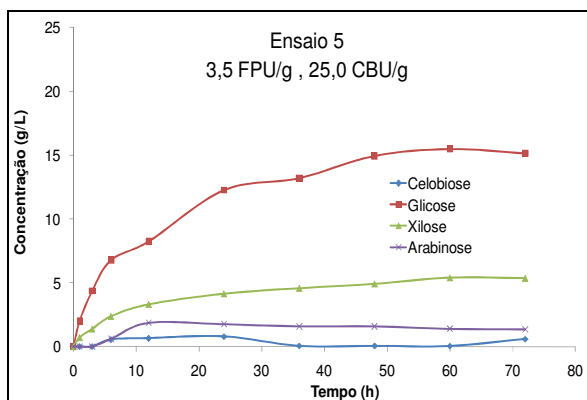
(b)



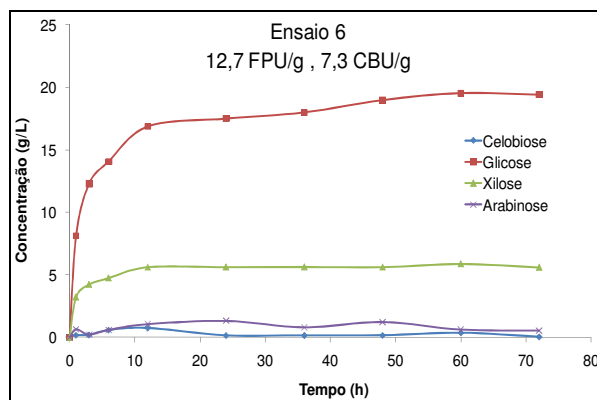
(c)



(d)



(e)



(f)

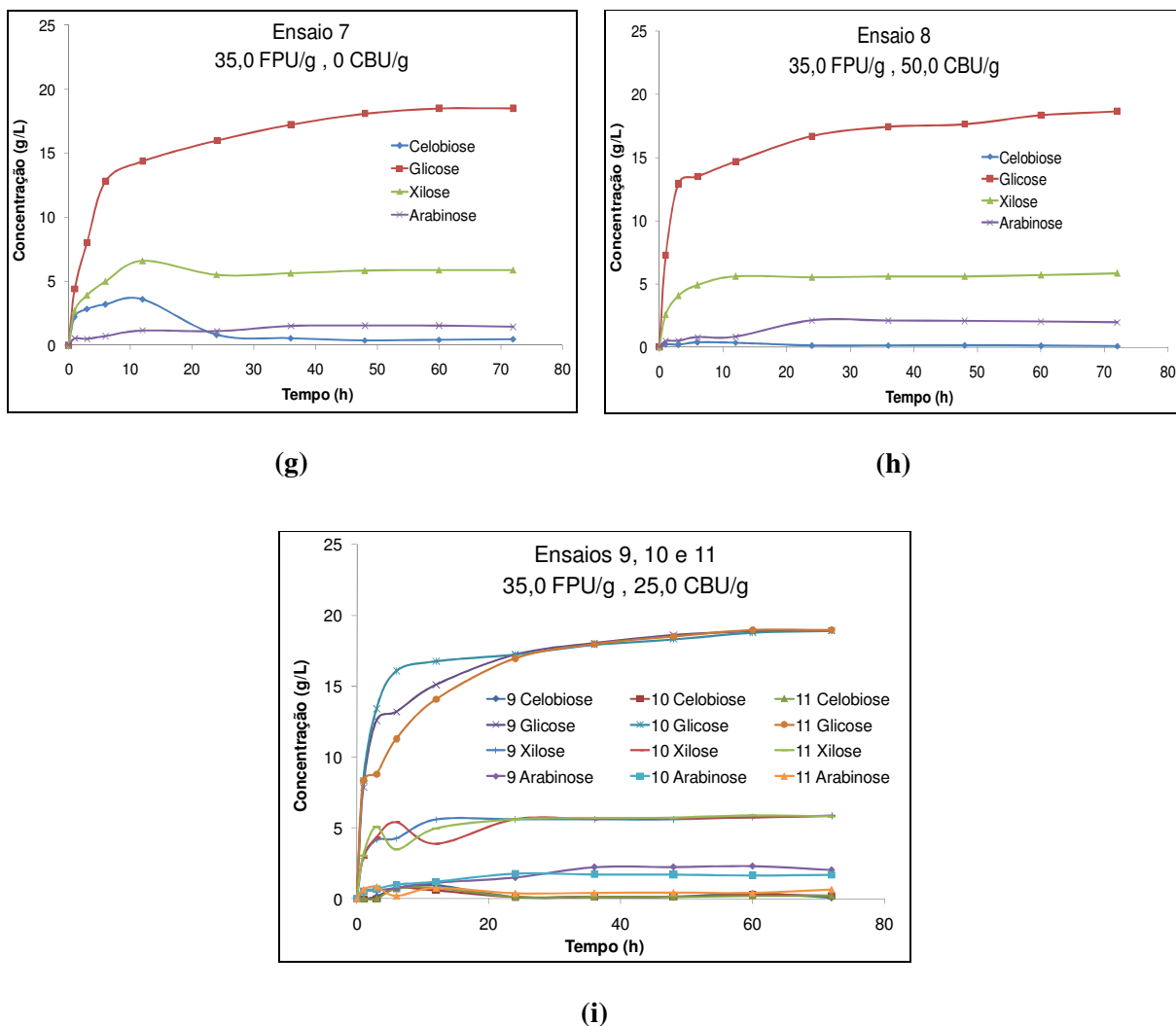


Figura 7.2: Perfis de hidrólise para a variação de carga enzimática da celulase e da β -glicosidase do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Baseando-se nos perfis de hidrólise de cada um dos ensaios, o rendimento da hidrólise para a glicose e xilose foram calculados e utilizados como resposta para a análise estatística. Optou-se por realizar a análise estatística apenas da glicose, já que será este o carboidrato utilizado para a produção de etanol de segunda geração

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para a etapa de otimização da carga enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio pode ser vista na Tabela 7.4, utilizando os rendimentos de glicose dispostos na Tabela 7.3.

Tabela 7.4: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	86,0	0,0962	893,2	0,000001*
(1) Celulase (g/g) (L)	3,67	0,118	62,2	0,000258*
Celulase (g/g) (Q)	-2,22	0,140	-31,6	0,000999*
(2) β-Glicosidase (g/g) (L)	0,161	0,118	2,73	0,112
β-Glicosidase (g/g) (Q)	0,224	0,140	3,19	0,0860*
1L * 2L	-0,0748	0,167	-0,897	0,464

* Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

Analisando a Tabela 7.4, nota-se que o efeito linear da β -glicosidase e a interação das enzimas não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Para analisar a resposta do experimento através da superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo foi então descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 7.5.

Tabela 7.5: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	86,0	0,0962	893,2	0,000001
(1) Celulase (g/g) (L)	3,67	0,118	62,2	0,000258
Celulase (g/g) (Q)	-2,22	0,140	-31,6	0,000999
(2) B-Glicosidase (g/g) (Q)	0,224	0,140	3,19	0,0858

A análise da variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 7.6.

Tabela 7.6: Análise da variância (ANOVA) para o estudo da variação da carga enzimática para o pré-tratamento com Ca(OH)_2 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	140,0	3	46,7	3,37 ¹
Resíduos (r)	96,8	7	13,8	696,43 ²
Falta de ajuste (faj)	96,8	5	19,4	
Erro puro (ep)	0,0556	2	0,027	
Total (T)	236,8	10		
% de variação explicada (R^2)	59,12			
% máxima de variação explicável	99,98			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F(\text{tab.})_{3,7} = 3,07$ no nível de 90% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{5,2} = 9,29$ no nível de 90% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

Analizando os dados da Tabela 7.6 é possível verificar que o modelo estatístico proposto não pode ser utilizado para fins preditivos, uma vez que o teste F para a falta de ajuste não foi satisfeito. Observa-se que o teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 3,37 que é maior que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{3,7} = 3,07$), sendo esta condição satisfeita. Em contrapartida, o modelo estudado apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 696,43, sendo este valor bem maior que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{5,2} = 9,29$).

Este resultado era esperado, já que a faixa de variação de carga enzimática é grande, ocasionando alta não linearidade na resposta, que não pode ser descrita por um modelo estatístico simples de segunda ordem como o proposto. No trabalho de RIVERA *et al.* (2010) mostramos que este problema pode ser resolvido usando redes neurais para modelar o comportamento do rendimento de glicose em função das cargas de celulase e β -glicosidase. A superfície de resposta pode então ser traçada usando o modelo neural e o rendimento ótimo obtido.

Mesmo o modelo proposto para a otimização da carga enzimática utilizando o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio não podendo ser usado para fins preditivos, a superfície de resposta foi traçada, uma vez que o comportamento qualitativo pode ser avaliado. A Figura 7.3 apresenta a superfície de resposta para o rendimento de glicose variando a carga enzimática da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

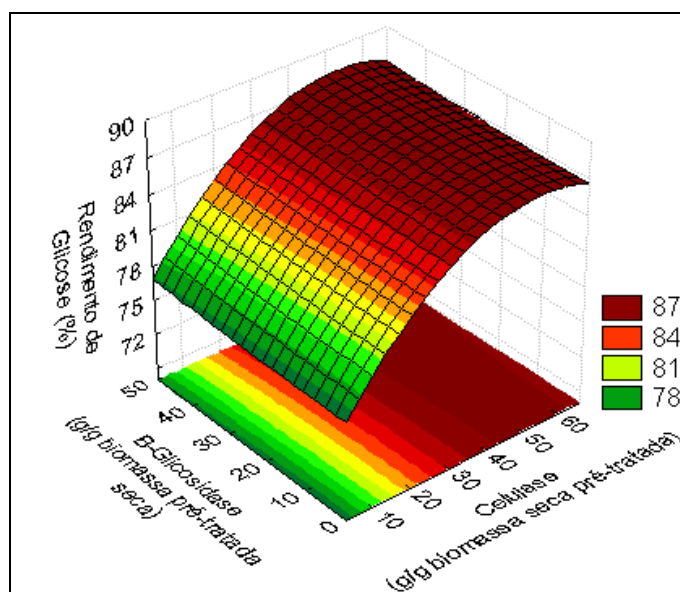


Figura 7.3: Superfície de resposta para o rendimento de glicose variando a carga enzimática da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

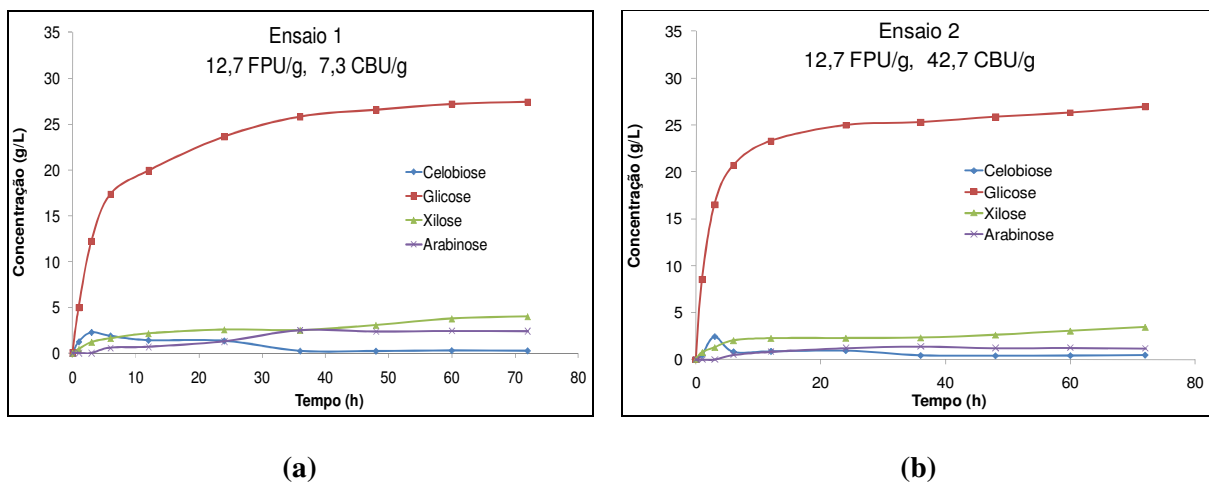
Ao analisar a superfície de resposta da Figura 7.3 podemos perceber uma ampla faixa de condições reacionais para maximizar o rendimento de glicose. De uma forma geral, o aumento da concentração da enzima celulase proporciona rendimentos ligeiramente maiores, podendo-se até observar uma possível maximização da resposta uma vez que a curva se apresenta praticamente estável no ponto máximo.

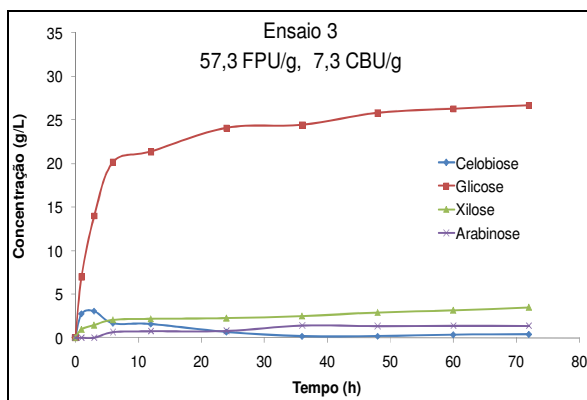
Como observado anteriormente na Tabela 7.3, mantendo fixa a concentração da enzima celulase e variando a concentração de β -glicosidase, como ocorre nos ensaios 1 e 2, 3 e 4, 7 e 8, o rendimento de glicose após a hidrólise é praticamente o mesmo. O mesmo não ocorre quando se

mantém fixa a concentração de β -glicosidase e se varia a concentração da celulase, o que ocasiona aumento no rendimento em glicose. Isso mostra que o efeito da enzima β -glicosidase é realmente bem menos expressivo do que a enzima celulase.

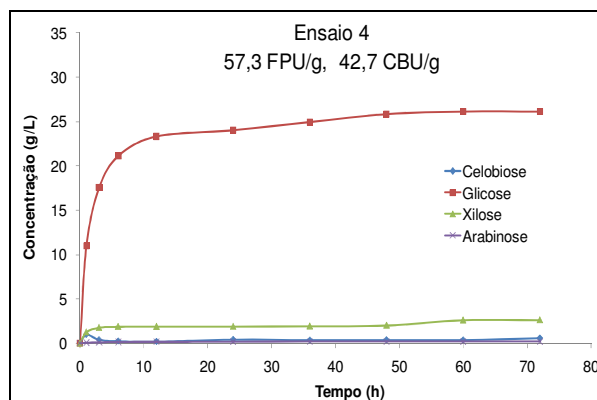
7.4.3. Análise Estatística do Rendimento de Hidrólise para a Glicose em Relação a Variação da Carga Enzimática para o Pré-Tratamento com H_2O_2

A Figura 7.4 (a-i) mostra os perfis de hidrólise para a concentração dos carboidratos liberadas em função do tempo de hidrólise.

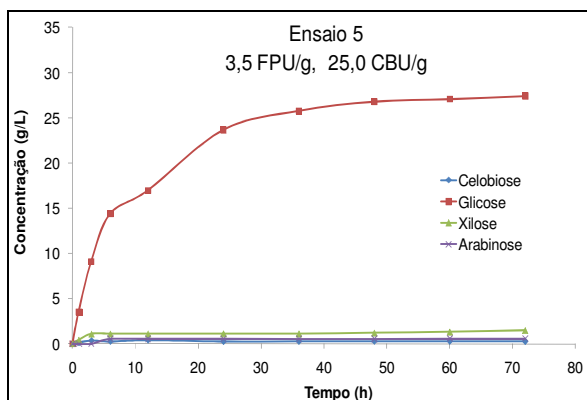




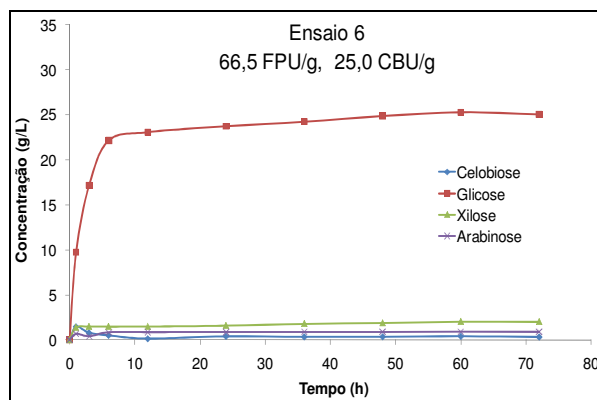
(c)



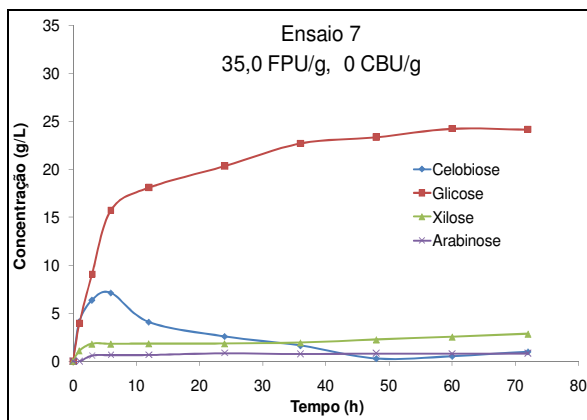
(d)



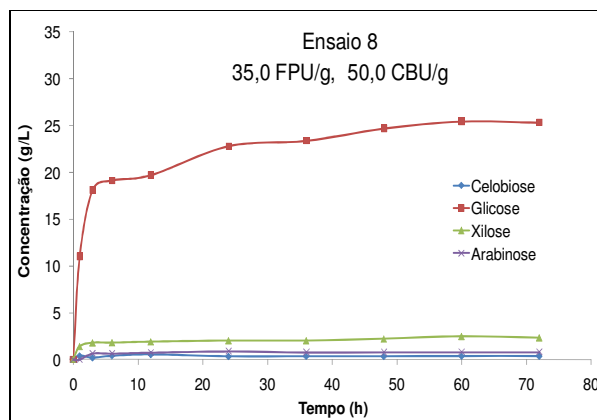
(e)



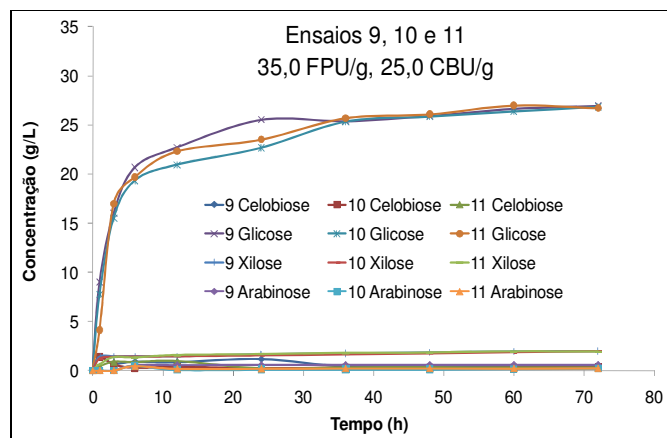
(f)



(g)



(h)



(i)

Figura 7.4: Perfis de hidrólise para a variação de carga enzimática da celulase e da β -glicosidase do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Baseando-se nos perfis de hidrólise de cada um dos ensaios, os rendimentos da hidrólise para a glicose foram calculados e utilizados como resposta para a análise estatística.

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para a etapa de otimização da carga enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino pode ser visualizada na Tabela 7.7, utilizando os rendimentos de glicose dispostos na Tabela 7.3.

Tabela 7.7: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	98,2	0,176	556,9	0,000003*
(1) Celulase (g/g) (L)	-2,06	0,216	-19,1	0,00274*
Celulase (g/g) (Q)	0,0415	0,257	0,323	0,778
(2)β-Glicosidase (g/g) (L)	0,330	0,216	3,05	0,0929*
β-Glicosidase (g/g) (Q)	-2,68	0,257	-20,9	0,00229*
1L * 2L	-0,0500	0,306	-0,327	0,775

* Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

Analisando a Tabela 7.7 nota-se que o efeito quadrático da celulase e interação das enzimas não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Para analisar a resposta do experimento através da superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo foi então descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 7.8.

Tabela 7.8: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis considerando a variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2 .

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Média	98,3	0,128	765,6	0,000002
(1) Celulase (g/g) (L)	-2,06	0,216	-19,1	0,00274
(2)β-Glicosidase (g/g) (L)	0,329	0,216	3,05	0,0928
β-Glicosidase (g/g) (Q)	-2,70	0,246	-21,9	0,00207

Para analisar a predição do modelo a ser proposto, foi calculada a variância (ANOVA), como mostra a Tabela 7.9.

Analisando a ANOVA da Tabela 7.9 é possível perceber que o modelo não pode ser usado para fins preditivos, uma vez que não satisfaz os requisitos necessários de validação dos dois testes F.

O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 3,49 que é maior que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{3,7} = 3,07$), sendo assim, a equação do modelo quadrático não apresenta problemas com a regressão. Entretanto, o modelo estudado apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 113,78, sendo este maior que o valor tabelado ($F(\text{tab.})_{5,2} = 9,29$).

O modelo proposto pode ser usado para traçar a superfície de resposta, mas não utilizado para a predição ou para fins de otimização. A superfície de resposta para o rendimento de glicose é representada na Figura 7.5.

Tabela 7.9: Análise da variância (ANOVA) para o estudo da variação da carga enzimática para o pré-tratamento com H_2O_2 .

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão (R)	79,7	3	26,6	3,49 ¹
Resíduos (r)	53,3	7	7,61	113,78 ²
Falta de ajuste (faj)	53,1	5	10,6	
Erro puro (ep)	0,187	2	0,0933	
Total (T)	133,0	10		
% de variação explicada (R^2)	59,9			
% máxima de variação explicável	99,9			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

* $F_{(tab.)_{3,7}} = 3,07$ no nível de 90% para a regressão

* $F_{(tab.)_{5,2}} = 9,29$ no nível de 90% para a falta de ajuste

*Valores calculados pelo software STATISTICA 7.0.

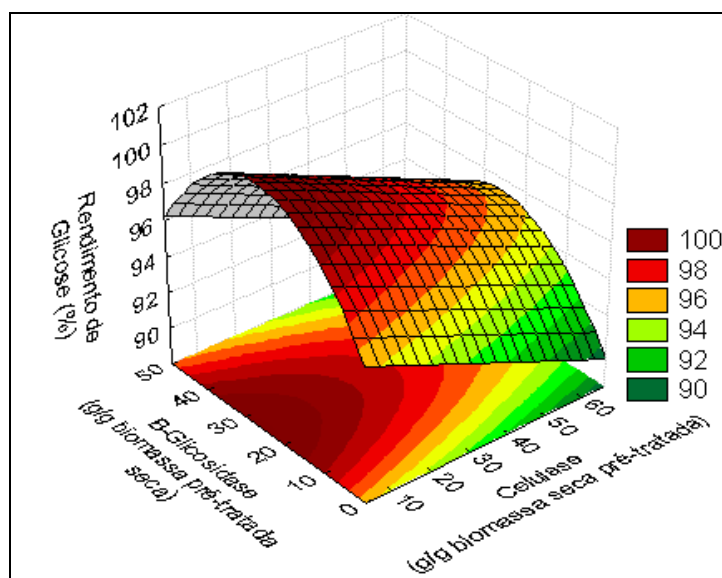


Figura 7.5: Superfície de resposta para o rendimento de glicose variando a carga enzimática da hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ao analisarmos as superfícies de resposta da Figura 7.5 pode-se perceber que os maiores rendimentos de glicose são observados quando se trabalha com baixas cargas de celulase e cargas intermediária de β -glicosidase.

Se compararmos este resultado obtido com o resultado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, nota-se que para o peróxido de hidrogênio alcalino um aumento da concentração de β -glicosidase apresenta um efeito mais significativo do que para o hidróxido de cálcio. Em contrapartida, a enzima celulase é mais importante, em termos de quantidade, para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Todos estes fatores apresentam relação direta com a composição química do material. Como o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino apresenta uma menor quantidade de hemicelulose e lignina na sua composição, a carga enzimática para altos rendimentos do processo é muito menor, mas sendo de suma importância a enzima β -glicosidase, já que a hidrólise ocorre de forma mais rápida sendo necessária a presença desta para não limitar a conversão da celobiose em glicose, minimizando assim seu acúmulo no meio reacional.

Para o bagaço pré-tratado com cal, a conversão ocorre de forma menos acelerada, necessitando de mais enzima celulase uma vez que parte dessa pode ficar retida na lignina.

7.4.4. Otimização da Hidrólise Enzimática

Como o objetivo principal deste capítulo é maximizar a produção de glicose para os dois pré-tratamento, foram realizados novos experimentos com diferentes cargas enzimáticas, com base nos perfis das superfícies de resposta das Figura 7.3 e 7.5.

A quantidade de carga enzimática utilizada nesses novos testes e os rendimentos de glicose e xilose após hidrólise enzimática são apresentadas na Tabela 7.10, para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e na Tabela 7.11, para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os melhores resultados marcados em negrito.

Tabela 7.10: Rendimentos de glicose no processo de otimização enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Ensaio	Celulase (FPU/g)	β -Glicosidase (CBU/g)	Rendimento de glicose na hidrólise (%)	Rendimento de xilose na hidrólise (%)
1	30,0	0	75,3 $\pm$ 0,54	72,3 $\pm$ 0,21
2	30,0	25,0	87,0 $\pm$ 0,48	86,2 $\pm$ 0,05
3	50,0	0	80,7 $\pm$ 0,46	92,3 $\pm$ 0,19
4	50,0	25,0	90,8 $\pm$ 0,38	95,6 $\pm$ 0,13
5	70,0	0	76,6 $\pm$ 0,32	91,5 $\pm$ 0,53
6	70,0	25,0	83,9 $\pm$ 0,72	95,7 $\pm$ 0,22
7	90,0	0	76,5 $\pm$ 0,77	100,0 $\pm$ 0,55
8	90,0	25,0	84,1 $\pm$ 0,31	100,0 $\pm$ 0,66

Tabela 7.11: Rendimentos de glicose no processo de otimização enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ensaio	Celulase (FPU/g)	β -Glicosidase (CBU/g)	Rendimento de glicose na hidrólise (%)	Rendimento de xilose na hidrólise (%)
1	12,7	0	75,2 $\pm$ 0,74	82,4 $\pm$ 0,36
2	12,7	25,0	100,0 $\pm$ 0,08	98,7 $\pm$ 0,57
3	3,5	0	46,7 $\pm$ 0,19	24,4 $\pm$ 0,61
4	3,5	25,0	100,0 $\pm$ 0,01	31,1 $\pm$ 0,20
5	1,0	0	15,4 $\pm$ 0,05	0,972 $\pm$ 0,49
6	1,0	25,0	6,4 $\pm$ 0,08	7,34 $\pm$ 0,44

Os novos resultados mostram que a quantidade de enzima necessária para obter o máximo rendimento de glicose para o bagaço pré-tratado com hidróxido é 50,0 FPU/g de bagaço seco pré-tratado de celulase e 25 CBU/g de bagaço seco pré-tratado de β -glicosidase, com rendimentos de 90,8% glicose e xilose 95,6% (Tabela 7.10). Concentração de celulase de 70 FPU/g de bagaço causou uma diminuição no rendimento em relação ao rendimento obtido com 50 FPU/g, o que mostra que mesmo no caso do pré-tratamento com cal, a partir de uma dada concentração o aumento na carga enzimática é prejudicial.

Para bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, duas opções são possíveis: trabalhar com 12,7 FPU/g bagaço seco pré-tratado e 25 CBU/g bagaço seco pré-tratado ou 3,5 FPU/g bagaço seco pré-tratado e 25 CBU/g bagaço seco pré-tratado, ambos com 100,0% de rendimento de glicose durante a etapa de hidrólise enzimática (Tabela 7.11).

Quando a glicose e xilose são açúcares de interesse, o primeiro caso, ensaio 2, é o mais recomendado, pois proporciona rendimentos de 100,0% de glicose e 98,7% de xilose. Sendo apenas a glicose o açúcar de interesse para a fermentação, pode-se escolher o segundo caso (ensaio 4), obtendo-se assim rendimentos de 100,0% de glicose e 31,1% de xilose. É importante observar que para os dois pré-tratamentos, o resultado apresentado nas superfícies de resposta (Figuras 7.3 e 7.5) foram consistentes com estes novos resultados.

7.5. Conclusões

Neste capítulo o efeito da carga enzimática na liberação dos açúcares fermentescíveis foi avaliado. O efeito da carga enzimática foi estudado através de análises utilizando o planejamento composto central (superfície de resposta), considerando como fatores a concentração de celulase e β -glicosidase. Os experimentos foram realizados utilizando bagaço não peneirado pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino nas condições previamente otimizadas.

Os modelos estatísticos mostraram evidência de falta de ajuste a 90% de confiança para os dois pré-tratamentos. Superfícies de reposta foram traçadas e utilizadas como perfil qualitativo para um novo estudo.

Os novos resultados mostram que a quantidade de enzima necessária para obter o máximo rendimento de glicose para o bagaço pré-tratado com hidróxido é 50,0 FPU/g de bagaço seco pré-tratado de celulase e 25 CBU/g de bagaço seco pré-tratado de β -glicosidase, com rendimentos de 90,8% glicose e xilose 95,6%.

Para bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, quando a glicose e xilose são açúcares de interesse, é interessante trabalhar com 12,7 FPU/g de bagaço seco pré-tratado de celulase e 25 CBU/g de bagaço seco pré-tratado de β -glicosidase, já que esta carga proporciona rendimentos de 100,0% de glicose e 98,7% de xilose. Sendo apenas a glicose o açúcar de interesse para a fermentação, pode-se trabalhar com 3,5 FPU/g de bagaço seco pré-tratado de celulase e 25 CBU/g de bagaço seco pré-tratado de β -glicosidase, obtendo-se assim rendimentos de 100,0% de glicose e 31,1% de xilose.

CAPÍTULO 8

ESTUDO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Neste capítulo é apresentado um estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O intuito desta etapa é determinar a máxima concentração de sólidos possível para entrada no reator de hidrólise sem que haja um comprometimento no andamento desta etapa e consequentemente menor liberação dos açúcares fermentescíveis. Além disso, foi testada a possibilidade de execução de processos em batelada alimentada, o que minimizaria alguns problemas operacionais.

8.1.Introdução

A hidrólise enzimática é afetada por diferentes fatores tais como: temperatura, tempo, pH, carga enzimática, concentração de substrato, concentração de produtos e características estruturais da biomassa.

Sabe-se que na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, para que haja uma recuperação eficiente deste produto, exige-se uma produção superior à 40 g/L (PHILLIPS e HUMPHREY, 1983), que por sua vez, necessita que a fermentação inicie com concentrações de açúcares fermentescíveis de pelo menos a 80 g/L.

Sendo assim, aumentar a concentração do substrato na etapa de hidrólise faz com que haja uma maior concentração de açúcares no meio, tornando consequentemente o processo mais viável em relação ao gasto energético na etapa de destilação, uma vez que favorece a diminuição da quantidade de água do processo. Entretanto, este aumento na concentração de sólidos pode levar a uma maior inibição pelo produto final uma vez que a concentração dos açúcares aumenta consideravelmente.

Além disso, elevadas concentrações de substrato podem acarretar problema de transferência de calor e massa devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa, proporcionando problemas difusionais para as enzimas (RUDOLF *et al.*, 2005). Aplicando o processo de batelada alimentada durante a etapa de hidrólise enzimática este tipo de problema poderia ser resolvido.

A Figura 8.1 mostra alguns fatores que limitam a hidrólise enzimática, principalmente quando se trabalha em altas concentrações de sólidos.

Segundo BREUIL (1992), altas concentrações de celobiose foram encontradas em hidrólises com concentrações de substrato maiores que 10% (m/v). A conversão desta em glicose pode ser aumentada com um aumento da quantidade de β -glicosidase, sendo essa, porém, inibida pelas altas concentrações de glicose.

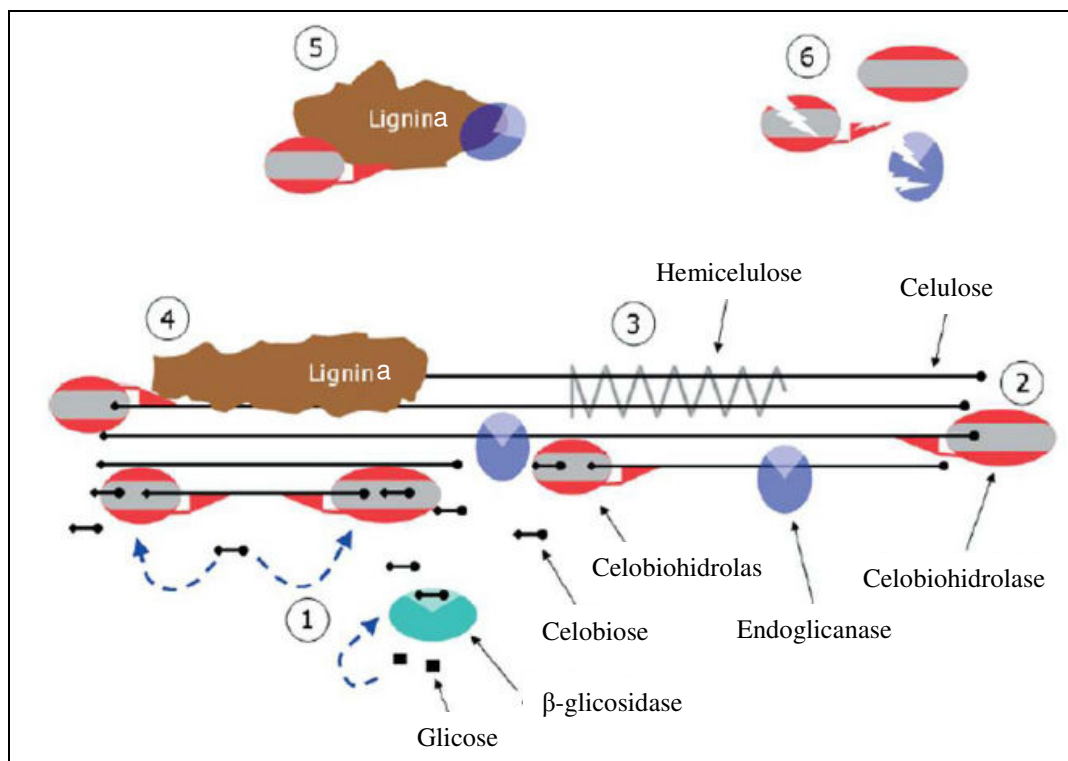


Figura 8.1: Fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose (JORGENSEN e OLSSON, 2006).

- 1) Inibição do produto de β -glicosidase e celobiohidrolases por glicose e celobiose, respectivamente
- 2) Ligação improdutiva da celobiohidrolases à celulose
- 3 e 4) As hemiceluloses e lignina associadas impedindo as celulasas de acessar a superfície da celulose
- 5) Enzimas podem ser adsorvidas na lignina
- 6) Desnaturação ou perda da atividade enzimática devido ao cisalhamento mecânico, atividade proteolítica ou baixa termoestabilidade.

8.2. Materiais

8.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização dos experimentos de aumento da concentração de sólidos na hidrólise enzimática, foram utilizadas as enzimas celulase e β -glicosidase, previamente analisadas conforme apresentado nas seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, e padrões cromatográficos para quantificação dos açúcares liberados após hidrólise, como apresentados na Tabela 3.1.

Além disso, alguns reagentes foram utilizados para o desenvolvimento do processo, sendo estes listados na Tabela 8.1.

Tabela 8.1: Características dos reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido cítrico monohidratado	Dinâmica	99,5
Ácido clorídrico	Merck	37
Azida de sódio	Vetec	99,0
Hidróxido de sódio	Nuclear	≥ 95

8.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, os seguintes equipamentos foram utilizados:

- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (em inglês HPLC - High Performance Liquid Chromatographic) da Waters, com amostrador 717 plus, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Empower 2;
- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo MA-832 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS Tecnopon, com precisão de 0,01;
- Peneiras circulares;
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

8.3.Procedimento Experimental

8.3.1. Reações de Hidrólise Enzimática

Foi utilizado, como matéria prima, o bagaço pré-tratado nas condições otimizadas para cada agente, como descrito na *seção 5.4.2.2* (hidróxido de cálcio) e *5.4.3* (peróxido de hidrogênio alcalino). Foi utilizada, em ambos os casos, uma concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento de 4% (m/v), como determinado anteriormente na *seção 6.4.3.1*, para pré-tratamento com hidróxido de cálcio e *6.4.3.2*, para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Em relação à hidrólise enzimática, foram utilizadas as cargas enzimáticas ótimas para cada pré-tratamento, determinadas no estudo de otimização da carga enzimática, descrito na *seção 7.4.4*. No caso do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, como foram encontradas duas opções de carga enzimática capazes de levar a altos rendimentos de glicose, optou-se neste estudo pela menor carga de celulase, que leva a baixos rendimentos de xilose, uma vez que o intuito é apenas a maximização da glicose.

Assim, as reações de hidrólise foram realizadas variando a concentração de sólidos e mantendo fixa a proporção de enzima e líquido reacional, além das condições operacionais, conforme apresentado na Tabela 8.2.

Tabela 8.2: Condições reacionais para o estudo do aumento da concentração de sólidos na hidrólise enzimática.

	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio alcalino
Concentração de sólidos (% , m/v)	1-6, 10 e 20*	1-5 e 10*
Meio reacional	100 mL de tampão citrato 0,05 mol/L + 0,07 g azida de sódio	
Celulase (FPU/g)	50	3,5
β-glicosidase (CBU/g)	25	25
Agitação (rpm)	100	100
Temperatura (°C)	50	50
pH	4,8	4,8

*As concentrações de 20% (cal) e 10% (peróxido) foram obtidas em batelada alimentada.

Os valores da concentração máxima de sólidos para cada uma das hidrólises foram determinados através de testes visuais. Foi testada a máxima concentração de sólidos possível para cada processo sem que houvesse prejuízo na homogeneização do material.

Assim, foi possível trabalhar em batelada, como apresentado na Tabela 8.2, com até 10% (m/v) de sólido para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e com até 5% (m/v) para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Foram então realizadas hidrólises em batelada com concentrações de 1 a 6% e com 10% (m/v) de bagaço no caso de pré-tratamento com cal e hidrólises em batelada com concentrações de 1 a 5% (m/v) de bagaço no caso do pré-tratamento com peróxido. Visando à obtenção de maiores concentrações de açúcares, foram realizados testes através do processo de batelada alimentada, para cada um dos pré-tratamentos, almejando assim dobrar a concentração máxima (em batelada) de sólidos no reator.

8.3.1.1.Reações de Hidrólise Enzimática para o Processo em Batelada Alimentada

Para o estudo do processo de batelada alimentada, foram realizadas, para os dois pré-tratamento, alimentações em dois tempos reacionais: após 6 e 12 h de hidrólise.

Para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, a hidrólise foi iniciada com aproximadamente 10,0 g de bagaço seco pré-tratado, com volume reacional e quantidade de enzima correspondente aos dados da Tabela 8.2. Depois de 6 horas de reação, adicionou-se aproximadamente 5,0 g do bagaço pré-tratado e a quantidade de enzima correspondente a essa massa. Após 12 horas do início da reação, foram adicionados mais 5,0 g do bagaço pré-tratado com a quantidade de enzima correspondente. A concentração total de sólidos foi de 20% (m/v). Neste estudo a hidrólise foi realizada até 96 h para garantir a total conversão do material celulósico.

O mesmo estudo foi realizado com o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, somente variando a concentração de sólidos inicial para 5% (m/v), com alimentações de 2,5 g após 6 e 12 h de reação, resultando em concentração total de sólidos de 10% (m/v).

8.3.2. Quantificação dos Carboidratos

Em todos os ensaios, alíquotas do hidrolisado foram retiradas ao longo da reação e fervidas para a desnaturação das enzimas, sendo posteriormente submetidas à quantificação dos açúcares por CLAE, como descrito na *seção 4.3.2.1*.

8.4. Resultados e Discussões

8.4.1. Efeito do Aumento da Concentração de Sólidos na Etapa de Hidrólise para o Bagaço Pré-Tratado com Hidróxido de Cálcio

Para a avaliação do aumento da concentração de sólidos na etapa de hidrólise enzimática para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, foram quantificadas as concentrações dos açúcares ao longo da reação. As Figuras 8.2, 8.3, 8.4 e 8.5 mostram os perfis de celobiose, glicose, xilose e arabinose, cujas concentrações são dadas em g/L. Os pontos onde foram efetuadas as alimentações no processo de batelada alimentada apresentam-se indicados.

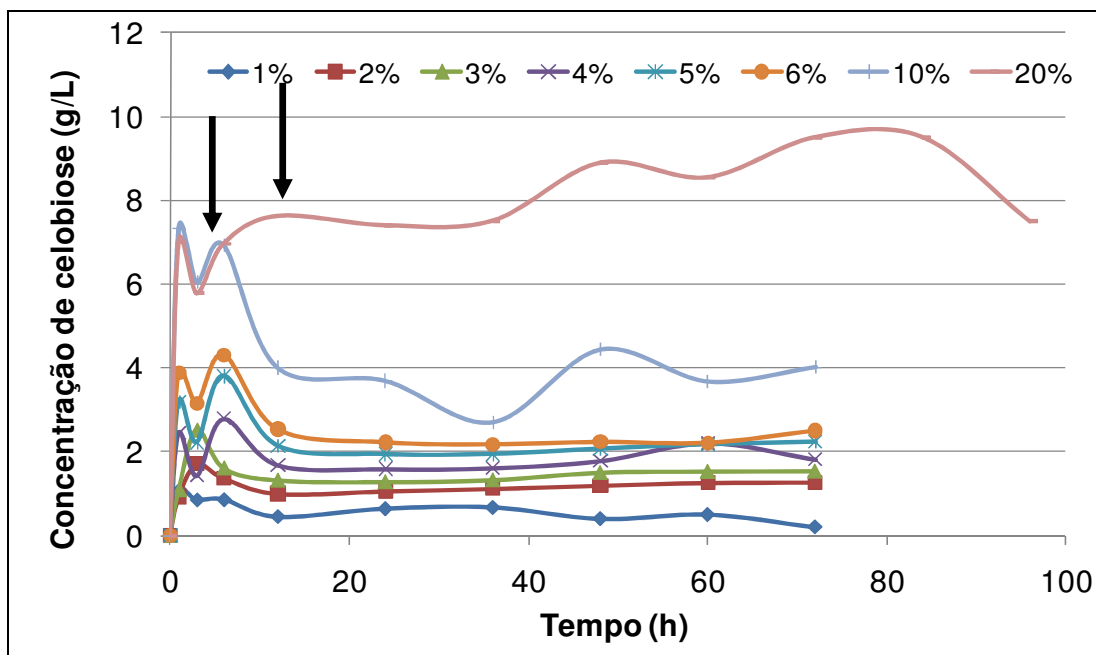


Figura 8.2: Concentração de celobiose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

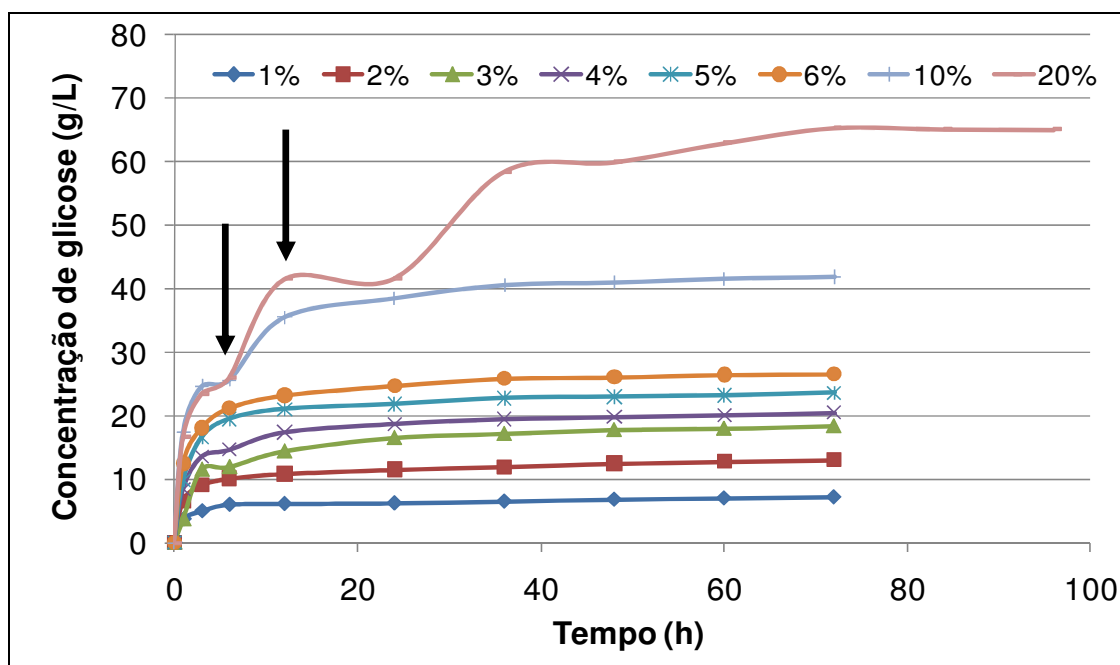


Figura 8.3: Concentração de glicose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

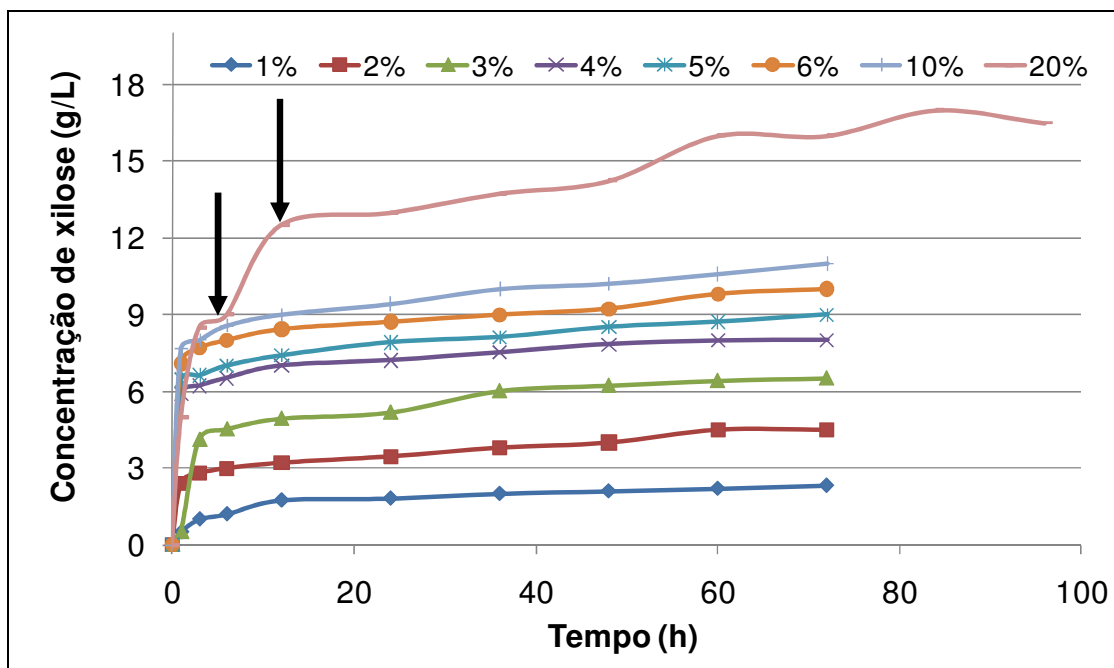


Figura 8.4: Concentração de xilose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

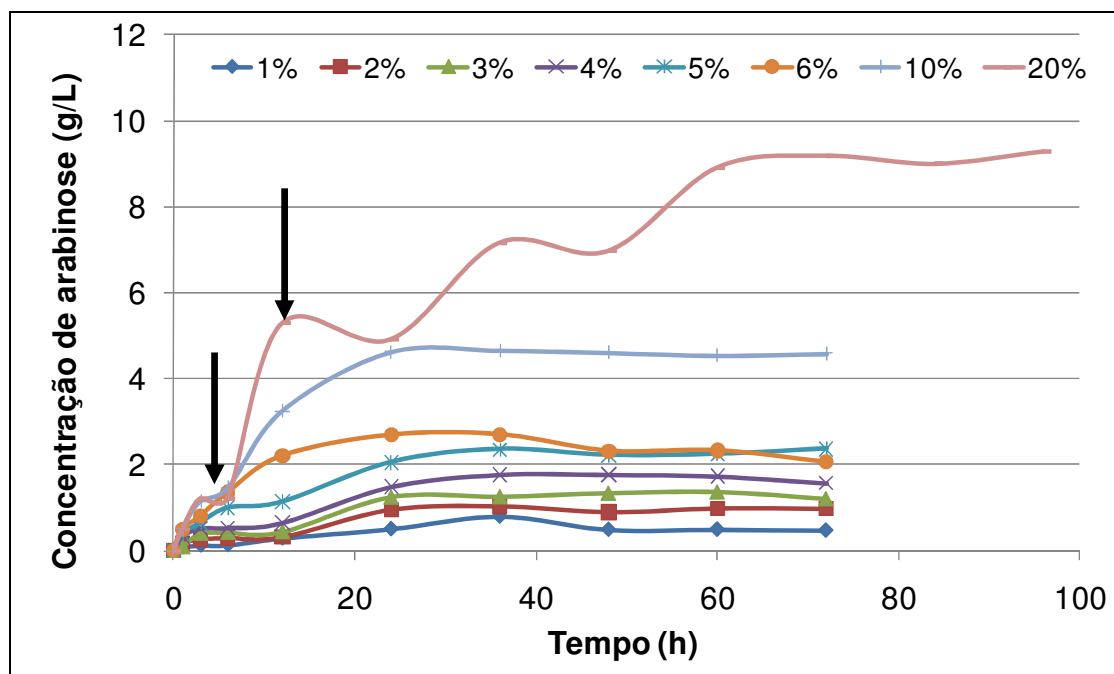


Figura 8.5: Concentração de arabinose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Analisando as Figuras 8.2, 8.3, 8.4 e 8.5, é possível notar que com o aumento da concentração de bagaço, os teores de celobiose, glicose, xilose e arabinose aumentam, como era de se esperar. As maiores concentrações de açúcares foram observadas no ensaio com o processo de batelada alimentada (20% (m/v) de sólidos), com concentrações máximas de 65,4 g/L de glicose, 16 g/L de xilose, 9,5 g/L de celobiose e 9,2 g/L de arabinose.

CHEN *et al.* (2007) realizaram um estudo do aumento da concentração de sólidos para a etapa de hidrólise enzimática utilizando o sabugo de milho pré-tratado com 1% de ácido sulfúrico (1:6) a 108°C por 3 h. A hidrólise em batelada alimentada foi iniciada com 10% (m/v) de sólidos, utilizando uma carga enzimática de 20 FPU/g biomassa seca pré-tratada para a celulase e 6,5 CBU/g biomassa seca pré-tratada para a β -glicosidase. A alimentação foi realizada duas vezes, após 6 e 12 h, obtendo uma concentração final de 20% (m/v) de sólidos, adicionando-se simultaneamente as enzimas celulase e β -glicosidase. Os resultados mostraram que foi possível obter uma concentração de 95,3 g/L de glicose e 116,3 g/L de açúcares redutores, com rendimento de hidrólise de 79,5% após 60 h de reação.

Nota-se na Figura 8.2 que para trabalhar com maiores concentrações de bagaço seria necessário usar maiores quantidades da enzima β -glicosidase, para que o excesso de celobiose pudesse ser convertido à glicose, aumentando assim o rendimento deste açúcar. A alta concentração de celobiose causa, ainda, inibição da enzima celulase, o que contribui para diminuir ainda mais o rendimento na etapa de hidrólise.

Assim, observa-se a necessidade uma nova otimização da etapa de hidrólise enzimática o que provavelmente ocasionaria um aumento no rendimento da glicose para as hidrólises onde foi trabalhado uma maior concentração de sólidos gerando além disso, ganhos na produtividade.

Este mesmo problema foi observado por CHEN *et al.* (2008), trabalhando com palha de milho pré-tratada com 2% NaOH a 80°C por 1 h. Os autores observaram que uma concentração elevada de celobiose permanecia no hidrolisado celulósico quando se aumentava a concentração de sólidos no reator de hidrólise, mantendo fixa a relação carga enzimática/concentração de sólidos. O acúmulo de celobiose causou inibição pelo produto, o que minimizou o rendimento de glicose após a etapa de hidrólise.

8.4.2. Efeito do Aumento da Concentração de Sólidos na Etapa de Hidrólise para o Bagaço Pré-Tratado com Peróxido de Hidrogênio Alcalino

As Figuras 8.6, 8.7, 8.8 e 8.9 mostram os perfis dos açúcares celobiose, glicose, xilose e arabinose liberados após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino a diferentes concentrações de sólidos. Os pontos onde foram efetuadas as alimentações no processo de batelada alimentada apresentam-se indicados.

Analizando as Figuras 8.6, 8.7, 8.8 e 8.9, é possível notar que com o aumento da concentração de bagaço, a concentração dos açúcares aumentam. As maiores concentrações foram observadas no ensaio com o processo de batelada alimentada (10% (m/v) de sólidos), sendo obtidas concentrações de 67,7 g/L de glicose, 7,9 g/L de xilose, 5,1 g/L de celobiose e 0,74 g/L de arabinose.

CHEN *et al.* (2008), trabalhando com palha de milho pré-tratada com 2% NaOH a 80°C por 1 h, usaram o processo de batelada alimentada visando aumentar a concentração de açúcares ao final do processo de hidrólise. Em uma das condições estudadas a hidrólise foi iniciada com uma concentração de 8% (m/v) e uma carga enzimática de 20 FPU/g biomassa pré-tratada e 10 CBU/g biomassa seca pré-tratada. Após 6 e 12 h de hidrólise, uma concentração de sólidos e enzima foi adicionado ao reator, atingindo uma concentração final de 11% (m/v). Após 72 h de hidrólise, os autores obtiveram um hidrolisado com concentração de 56,7 g/L de glicose, 23,6 g/L de xilose e 5,7 g/L de arabinose, com um rendimento de hidrólise 83,3%.

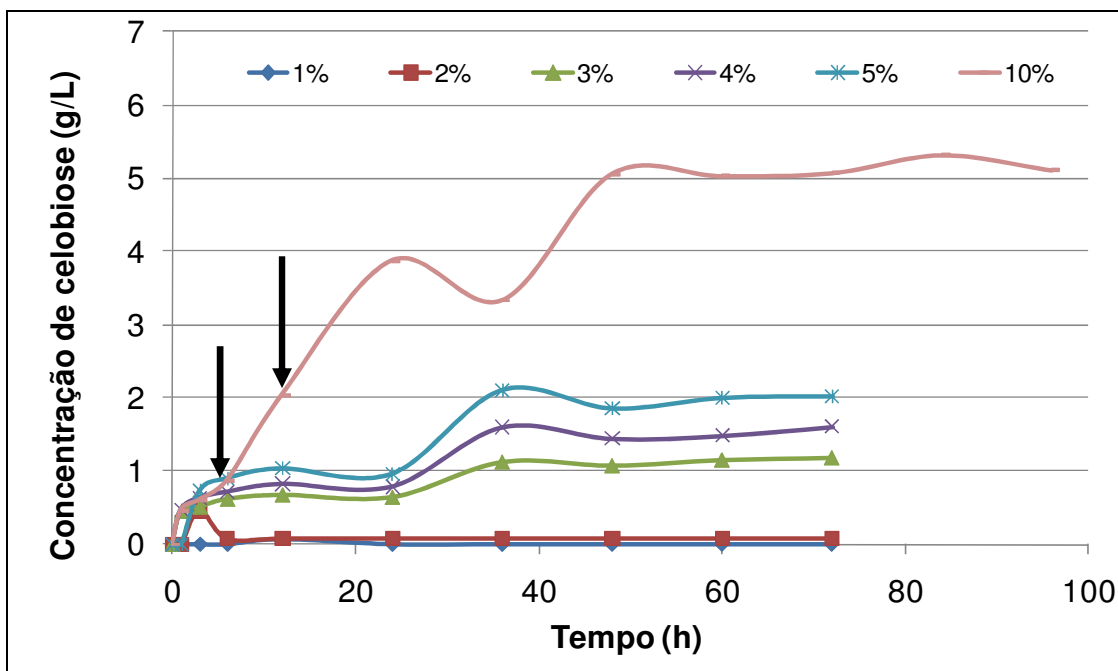


Figura 8.6: Concentração de celobiose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

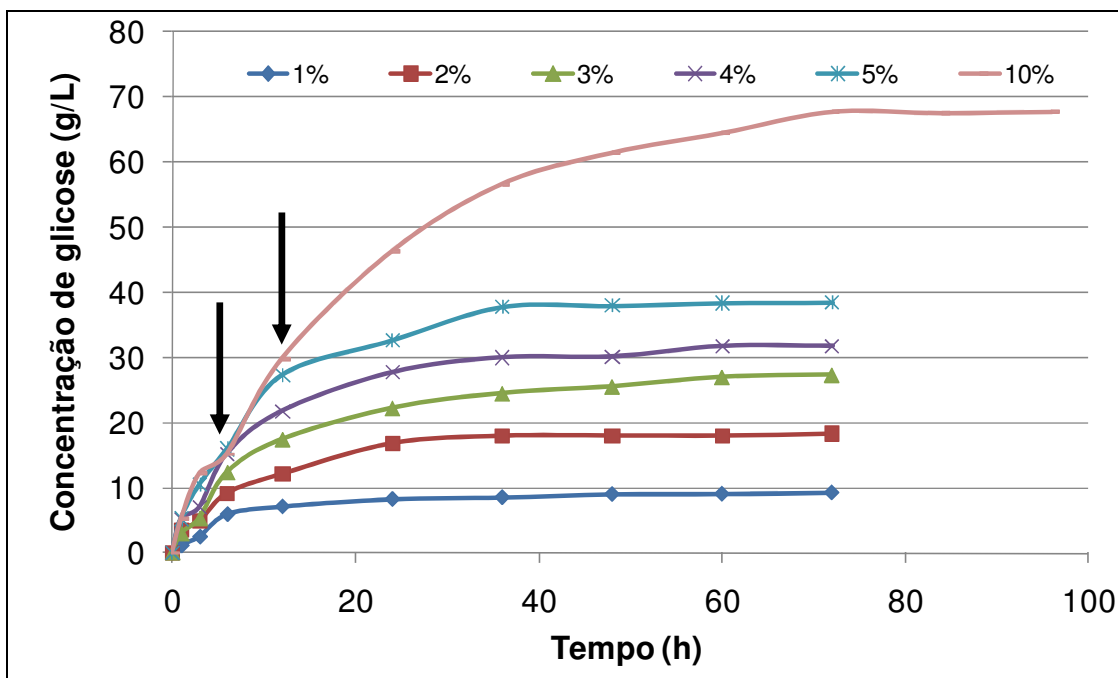


Figura 8.7: Concentração de glicose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

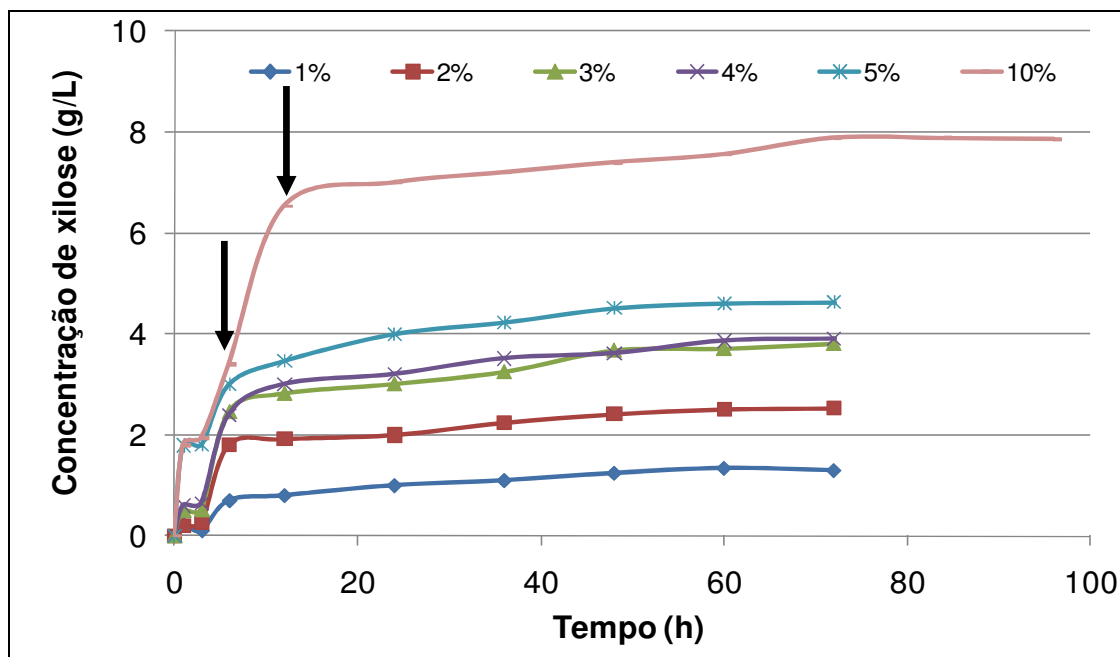


Figura 8.8: Concentração de xilose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

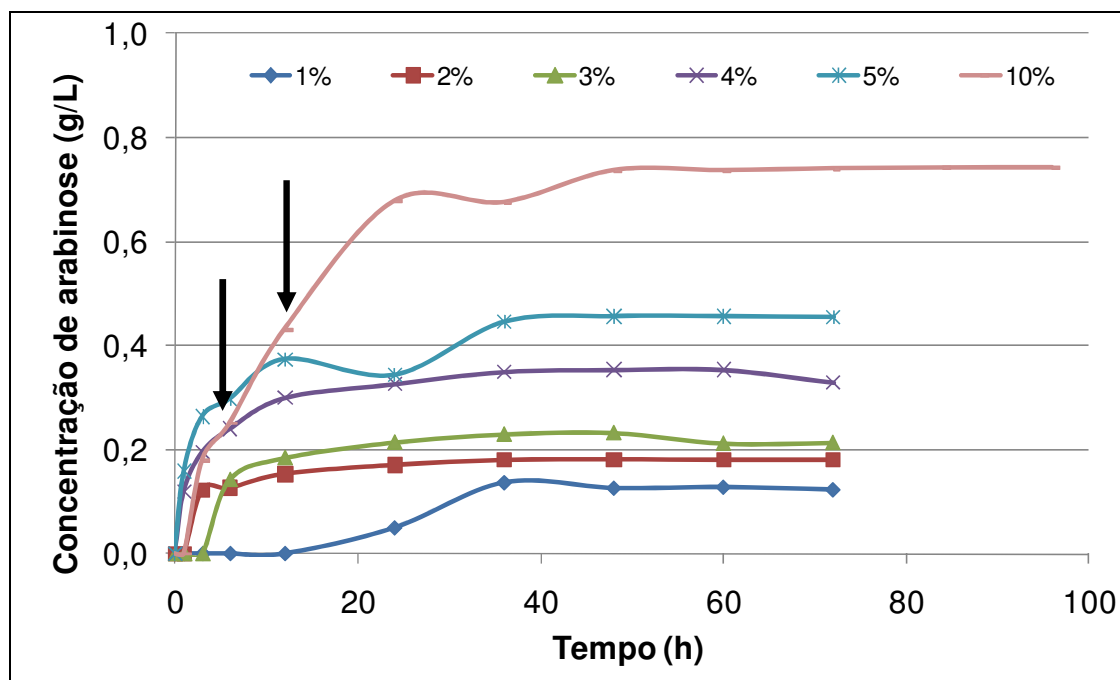


Figura 8.9: Concentração de arabinose para os ensaios variando a concentração de sólido na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ao compararmos a concentração de glicose liberada pelo bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (Figura 8.3) com o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (Figura 8.7), nota-se uma menor eficiência do primeiro processo, uma vez que uma maior quantidade de biomassa pré-tratada é utilizada, 20% de sólidos (cal) contra 10% de sólidos (peróxido), atingindo concentrações de glicose máximas bem similares: 65,4 g/L e 67,7 g/L, respectivamente.

8.4.3. Rendimentos do Processo de Hidrólise

Visando relacionar o aumento da concentração de sólidos com a eficiência do processo, foi calculado o rendimento da hidrólise enzimática e o rendimento global para os açúcares glicose e xilose liberados após a etapa de hidrólise de cada pré-tratamento. A Tabela 8.3 apresenta os rendimentos, calculado conforme descrito no *apêndice XI*.

Através de análise da Tabela 8.3 nota-se que o rendimento de glicose após a hidrólise enzimática diminui com o aumento da concentração de sólidos. Mesmo produzindo altas concentrações de açúcares, os processos em batelada alimentada levaram a rendimentos bem abaixo dos processos que utilizam menores concentrações de sólidos. Para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio foi observado um rendimento de apenas 44,5%, enquanto que para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, um rendimento de 74,1% foi observado no processo alimentado. Estes valores poderiam aumentar fazendo-se uma nova otimização para determinar a carga enzimática adequada em altas concentrações de sólidos. CHEN *et al.* (2007) obtiveram rendimento de glicose de 79.5% na hidrólise trabalhando em batelada alimentada até 20% de sólidos (m/v) para sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e CHEN *et al.* (2008) obtiveram rendimento de glicose de 83.3% na hidrólise trabalhando com palha de milho pré-tratada com NaOH em batelada alimentada até 11% de sólidos (m/v).

Tabela 8.3: Rendimentos de glicose e xilose da etapa de hidrólise e hidrólise + pré-tratamento (global) para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Concentração de sólidos (%)	Rendimento de glicose na hidrólise (%)		Rendimento de xilose na hidrólise (%)		Rendimento global para a celulose (%)		Rendimento global para a hemicelulose (%)	
	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio
1	97,6	100,4	100,4	96,6	99,0	95,3	99,0	24,1
2	89,1	100,1	97,4	94,0	96,8	99,2	96,8	28,4
3	83,5	99,9	93,7	94,1	89,5	98,8	89,5	28,2
4	69,7	86,9	86,5	72,5	75,1	86,7	75,1	22,0
5	64,4	84,3	77,9	68,8	69,8	84,2	69,8	21,0
6	60,4	-	72,1	-	65,4	-	65,4	-
10	57,0	-	47,6	-	61,9	-	61,9	-
10 (batelada alimentada)	-	74,1	-	58,6	-	75,7	-	17,9
20 (batelada alimentada)	44,5	-	34,6	-	50,6	-	23,4	-

A diminuição do rendimento, quando se aumenta a concentração de sólidos e enzimas no reator, também foi observada por ZHU (2005). Segundo o autor, com o aumento da concentração de sólidos e enzima, há uma maior formação do complexo enzima-substrato, aumentando assim a taxa de hidrólise que por sua vez leva a uma maior liberação de glicose, o que acaba inibindo as enzimas.

Observou-se que a diminuição do rendimento da glicose liberada após a etapa de hidrólise apresentou um maior efeito para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio quando comparado com os resultados obtidos para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Este fato pode ter relação direta com a composição química do material pré-tratado (Tabela 5.11) e com a maior carga enzimática adicionada ao meio (Tabela 8.2). O residual de hemicelulose e lignina no material pré-tratado com hidróxido de cálcio é mais expressivo o que pode dificultar na interação do complexo celulolítico com a celulose a ser hidrolisada. Além disso, a alta concentração de celulase utilizada, 14,3 vezes maior para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, pode favorecer uma maior adsorção destas enzimas à lignina residual, diminuindo assim os sítios ativos.

Em relação ao rendimento global, foi considerado para efeito de cálculo, além da glicose e xilose liberadas no meio reacional, a celobiose e arabinose, respectivamente. Assim, para o rendimento global da celulose, houve em alguns casos, um aumento do rendimento devido ao fato de se ter contabilizado a celobiose presente no meio. O mesmo fato foi observado para o rendimento da hemicelulose, considerando além da xilose, a arabinose liberada no meio reacional

Em se tratando do rendimento global da celulose, observa-se principalmente, para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, que há um aumento considerável se comparado com o rendimento apenas da etapa de hidrólise. Este fato é bastante interessante, o que mostra que se houvesse uma maior conversão da celobiose presente no meio, o rendimento do processo de hidrólise aumentaria substancialmente.

Para os dois pré-tratamentos, os melhores rendimentos são encontrados trabalhando com até 3% de sólidos, resultado semelhante ao observado por GARCIA (2009) e GARZÓN FUENTES (2009).

Com o objetivo de analisar a relação existente entre os rendimentos de glicose na etapa de hidrólise e a concentração de sólidos para cada um dos pré-tratamentos, foi traçado a Figura 8.10.

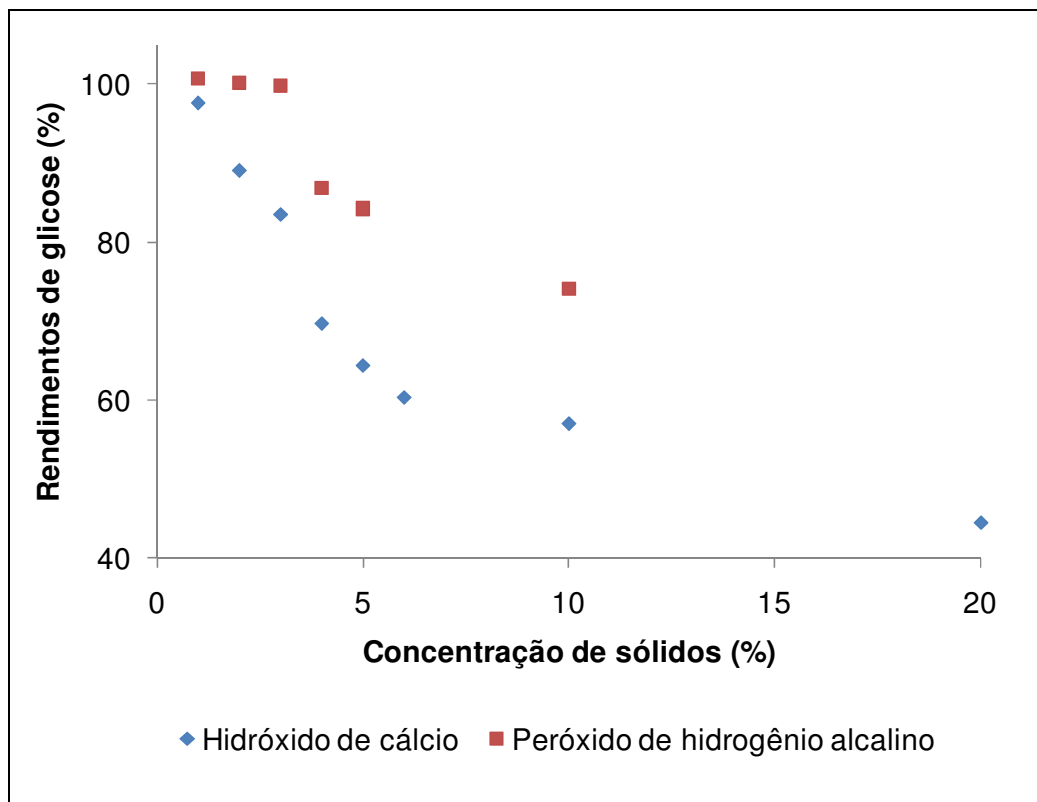


Figura 8.10: Relação entre o rendimento de glicose e a concentração de sólidos na hidrólise.

8.5. Conclusões

Neste capítulo foi estudado o aumento da concentração de sólido durante a etapa de hidrólise enzimática para o bagaço pré-tratado nas condições ótimas de hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino e hidrolisado também nas condições ótimas de cada pré-tratamento.

Foi possível observar que com o aumento da concentração de sólidos durante a etapa de hidrólise enzimática há um aumento da concentração de açúcares liberados no meio reacional mas, em contrapartida, observa-se uma diminuição da eficiência do processo.

Para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio foi possível trabalhar com uma concentração de sólidos de até 10% sem o processo de alimentação. O maior rendimento de glicose na hidrólise foi obtido para a concentração de 1% sólidos, com 97,6% da celulose sendo hidrolisada. O menor rendimento foi observado para a hidrólise com 10% de sólidos, com rendimentos de 57,0%.

Para o bagaço pré-tratado com peróxido foi realizado hidrólises com até 5% de sólidos sem o processo de alimentação. Rendimentos de aproximadamente 100% de glicose foram obtidos trabalhando com 1, 2 e 3% sólidos. O rendimento mais baixo foi obtido com 5% de sólidos, com 84,3%.

Em relação aos processos alimentados, foi possível observar uma menor eficiência na hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, uma vez que uma maior quantidade de biomassa pré-tratada foi utilizada, 20% de sólidos contra 10% de sólidos para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, atingindo concentrações de glicose máximas bem similares: 65,4 g/L e 67,7 g/L, respectivamente.

Assim, aumentando a concentração de sólidos durante a hidrólise enzimática é possível aumentar consideravelmente a concentração de açúcar, mas isso leva a uma perda considerável do rendimento do processo. Para as etapas seguintes, foram utilizados 3% (m/v) de sólidos na etapa de hidrólise enzimática, já que este resultado levou a altas concentrações de açúcares e altos rendimentos do processo.

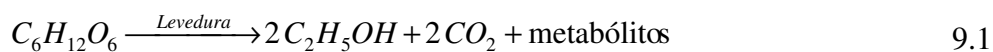
CAPÍTULO 9

FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados das fermentações dos hidrolisados visando à produção de etanol de segunda geração. Fermentações foram realizadas com os hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática, nas condições otimizadas, do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, também nas condições otimizadas. Efetuaram-se os estudos em modo batelada e contínuo, visando à avaliação da influência dos inibidores nesta etapa. No processo contínuo, optou-se por adicionar o hidrolisado em diferentes concentrações ao melaço industrial, objetivando assim uma integração do processo fermentativo convencional com o processo de etanol lignocelulósico.

9.1.Introdução

O processo de fermentação alcoólica consiste em uma série de reações químicas catalisadas por um microrganismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ocorrendo em condições de anaerobiose como meio de provisão de energia para manutenção das atividades vitais e crescimento da levedura. A reação de fermentação pode ser resumida como:



O rendimento teórico (coeficiente de Gay-Lussac) da reação 9.1 é de 0,511 g etanol/g glicose. No entanto, parte dos açúcares presentes no meio é consumida em reações paralelas necessárias para a síntese de etanol. Assim, além do etanol e gás carbônico, há também a formação de outros subprodutos em menores quantidades, como o glicerol e ácidos orgânicos, principalmente o acético e succínico, além de outros álcoois e levedura. Por estes motivos, costuma-se observar rendimentos na fermentação alcoólica industrial da ordem de 90% (DIAS, 2008).

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos tem sido estudada com grande interesse nos últimos anos, mas sua produção em escala comercial ainda não se tornou viável. Estudos relacionados à integração energética, aumento do rendimento fermentativo e integração das operações unitárias, aumento do rendimento das reações de hidrólise e ao aproveitamento completo de todas as frações do bagaço são necessários para viabilizar a tecnologia de hidrólise.

Duas opções para o processo de fermentação do hidrolisado lignocelulósico podem ser consideradas. A primeira alternativa considera a fermentação realizada após o término da etapa de hidrólise, permitindo que o processo de produção de álcool a partir do material lignocelulósico seja acoplado completamente à planta convencional, com o hidrolisado sendo misturado ao caldo de cana ou ao melaço alimentado à dorna de fermentação.

Neste processo é possível reduzir o impacto dos inibidores formados na etapa de pré-tratamento ou hidrólise ácida decorrentes da decomposição de pentoses e hexoses. Sabe-se que estes inibidores, destacando-se o furfural, 5-hidroximetilfurfural e o ácido acético, podem afetar negativamente o processo fermentativo, promovendo a inibição da velocidade específica de crescimento de microrganismos, a diminuição da produção específica de etanol e a redução de síntese de biomassa (ROSSELL, 2006a).

A fermentação do hidrolisado acoplada à fermentação convencional parece ser a forma mais atraente de operar o processo, já que possibilita a integração da produção de etanol de primeira e segunda geração. Isso proporciona uma menor alteração nas usinas já existentes, sejam em relação a equipamentos ou mesmo alterações de condições do processo.

Uma segunda alternativa para a conversão de celulose a etanol é a realização do processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), ocorrendo em um único reator, e levando teoricamente, a maiores velocidades, maiores rendimentos e concentrações mais elevadas de produto, principalmente devido à redução do efeito de inibidores no processo. Como desvantagem, este processo exige o estabelecimento de valores intermediários de temperatura, pH, dentre outros fatores, para que isso favoreça as operações tanto de hidrólise como da fermentação que têm temperaturas ótimas muito diferentes, de 50°C e 34°C, respectivamente.

Segundo ROSSELL (2006a), estudos realizados por KIRALLY *et al.* (2003), ZAUTSEN *et al.* (2004) e ROSSELL *et al.* (2006b) mostram a fermentação de licor de hidrólise proveniente do processo Dedini Hidrólise Rápida (DHR). O licor proveniente da hidrólise foi misturado com xarope e mel residual, a fim de reduzir o impacto dos inibidores provenientes da hidrólise ácida organosolv, mantendo a fermentação em condições operacionais próximas às ótimas: processo com reciclo de fermento, vinho final de 8,5 °GL e temperatura de 34°C. Segundo o autor, os resultados obtidos foram positivos, sendo estabelecidas as condições para realização da fermentação alcoólica do licor obtido no processo DHR (Dedini Hidrólise Rápida).

9.2.Materiais

9.2.1. Reagentes e Outros Materiais de Consumo

Para a realização das fermentações dos hidrolisados foram utilizados os reagentes químicos listados na Tabela 9.1.

Além dos reagentes, foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cultivada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, sendo obtida na Usina Santa Adélia S/A, unidade de Jaboticabal - SP. Os antibióticos ampicilina (EMS 500 mg) e ácido nalidíxico (Wintomylon 50 mg/mL) foram utilizados no mosto para evitar a proliferação de bactérias.

Para o processo contínuo, foi utilizado o melaço de cana proveniente da Usina Virgolino de Oliveira S/A – Açúcar e Álcool, unidade de Itapira - SP.

Tabela 9.1: Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fabricante	Pureza (%)
Ácido clorídrico	Merck	37
Álcool etílico	Synth	96
Ágar-ágar	Merck	-
Azul de metileno	Vetec	-
Cloreto de amônio	Vetec	98
Cloreto de potássio	Synth	99
Extrato de levedura	Oxoid	-
Extrato de malte	Oxoid	-
Fosfato dipotássico	Ecibra	99,9
Glicose	Merck	99,9
Sacarose	Synth	98
Sulfato de magnésio hepta hidratado	Synth	98-102
Peptona	Oxoid	-

Para a quantificação dos açúcares, etanol, glicerol e inibidores presentes no vinho de levedurado, foi utilizado a CLAE sendo os padrões apresentados na Tabela 3.1.

9.2.2. Equipamentos

Nesta etapa, os seguintes equipamentos foram utilizados:

- Autoclave vertical modelo AV 50 da marca Phoenix;
- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Câmara de fluxo laminar;
- Centrífuga Modelo NT 810 da marca Nova Técnica;
- Cromatógrafo líquido modelo Varian 9010 com detector de índice de refração (Chrom Tech Inc., Modelo RI-2000) e ultravioleta (Varian, modelo 9050), utilizando o software Clarity Lite (DataApex, Czech Republic);

- Destilador de água tipo Pilsen Q341 da marca Quimis;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Fermentador Bioflo III de 2 L, da marca New Brunswick Scientific Co., equipado com pHmetro e turbidímetro, com sistema de medição on-line de vazão de CO₂, pH e turbidez;
- Bomba peristáltica Master Flex L/S modelo 7550-20 da marca Cole-Parmer Instrument Company;
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo MA-832 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (shaker);
- Medidor de pH industrial MPI 2000 da marca MS Tecnocon, com precisão de 0,01;
- Refratômetro da marca VEB Carl Zeiss Jena;
- Microscópio óptico modelo Variant Jenamed da marca Carl Zeiss Jena acoplado com câmera digital Kodak DX 4530;
- Sistema para purificação de água Milli-Q[®] Ultrapure da marca Millipore.

9.3. Procedimento Experimental

9.3.1. Preparação da Levedura

A cultura estoque de ágar inclinado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtida da usina Santa Adélia S/A, foi ativada utilizando 10,0 mL de um meio semi-sólido de ágar inclinado a 30°C por 24 h. A composição do meio é apresentada na Tabela 9.2.

Tabela 9.2: Composição do meio de ativação para cultivo de *S. cerevisiae*.

Componentes	Concentração (kg/m ³)
Ágar-ágar	20,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Glicose	10,0

Após este período, a levedura foi então inoculada em 2,0 mL de um meio líquido, cuja composição química é a mesma apresentada na Tabela 9.2, apenas sem a presença do ágar-ágar. O meio foi incubado sem agitação a 30°C por 24 h.

Na etapa de crescimento do inóculo, a levedura ativada foi então transferida para 10,0 mL de um meio de crescimento, cuja composição é apresentada na Tabela 9.3.

Tabela 9.3: Composição do meio de crescimento do inóculo.

Componentes	Concentração (kg/m ³)
Sacarose	20,0
Extrato de levedura	5,0
Fosfato dipotássico	5,0
Cloreto de amônio	1,5
Cloreto de potássio	1,15
Sulfato de magnésio hepta hidratado	0,65

O meio de crescimento teve o seu pH ajustado para 6,8 utilizando uma solução de 1,0 mol/L de ácido clorídrico. O crescimento da levedura foi realizado em erlenmeyers aletados, mantidos em um shaker sob agitação de 150 rpm por 24 h a 30°C.

Após a fase de preparação, transferiu-se o meio contendo os microrganismos para um inoculador previamente esterilizado e, através deste, as células foram adicionadas ao fermentador onde já estava presente o mosto de composição e volume determinado para o processo contínuo ou batelada. Os passos para preparação do inóculo são apresentados na Figura 9.1.

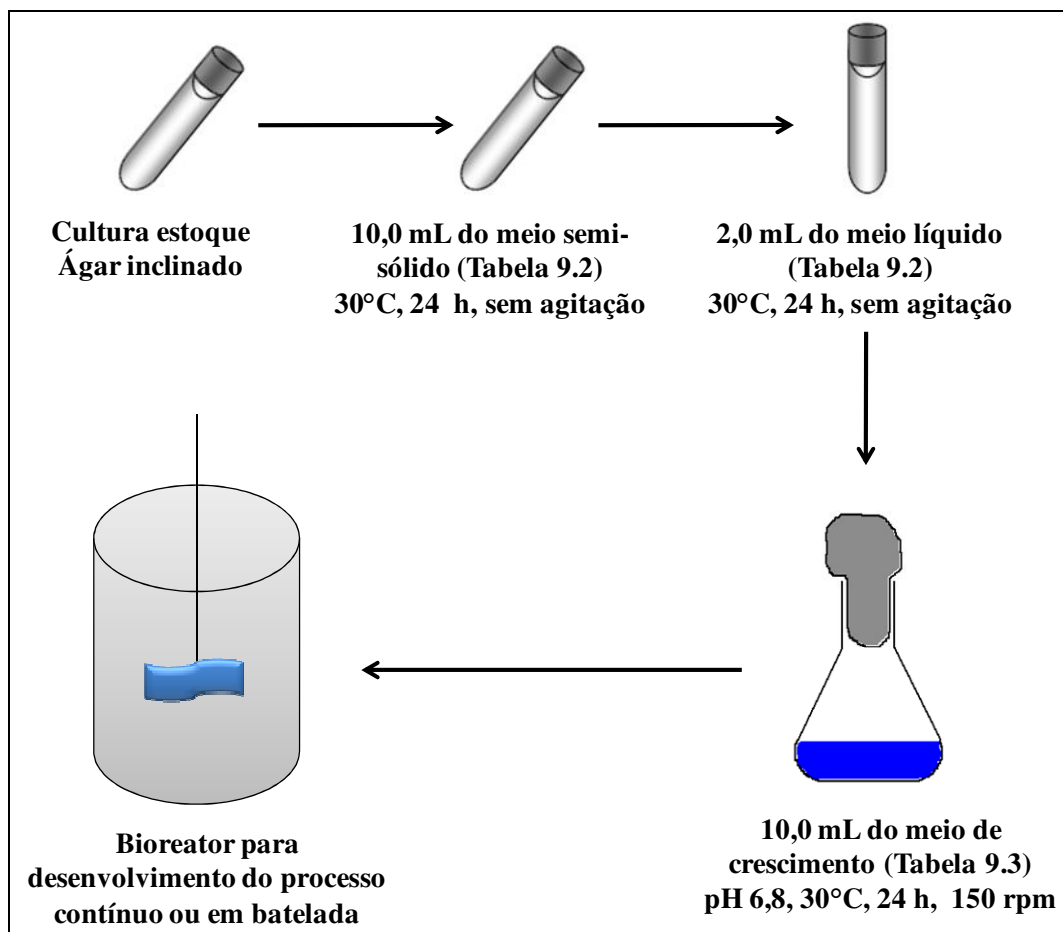


Figura 9.1: Diagrama das etapas de preparo do inóculo para fermentação.

Todos estes procedimentos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar que teve suas superfícies esterilizadas com álcool etílico 70°GL e radiação ultravioleta por 30 minutos, antes de toda manipulação de material na mesma.

9.3.2. Preparação do Mosto para o Processo Contínuo

Para o processo contínuo, foi utilizado o melaço de cana-de-açúcar diluído a uma concentração de aproximadamente 70,0 g/L de ART. Em intervalos de tempos pré-determinados, foram adicionados ao mosto diferentes porcentagens (em massa) de cada um dos hidrolisados obtidos nas condições ótimas de pré-tratamento e hidrólise. Aproximadamente 10,0 L de cada

hidrolisado foram preparados.

A Tabela 9.4 apresenta a composição orgânica e inorgânica do melaço determinada por ANDRADE (2007) e a Tabela 9.5 apresenta a composição de cada um dos hidrolisados, obtidos após pré-tratamento e hidrólise enzimática nas condições otimizadas, que foram utilizados no processo de fermentação contínua.

Tabela 9.4: Composição do melaço original a 200 g/L (ANDRADE, 2007).

Componente	Resultados analíticos
Carbono	6,0 % m/m
Nitrogênio	< 0,5 % m/m
Fenóis totais	87,5 mg/Kg
Ferro	< 0,020 % m/m
Magnésio	0,024 % m/m
Potássio	0,313 % m/m
Zinco	16 mg/Kg
Pureza	77 %
pH	6,12

Tabela 9.5: Composição do hidrolisado obtido para cada um dos pré-tratamentos.

Composição do hidrolisado (g/L)	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio alcalino
Glicose	16,591	23,872
Xilose	6,500	2,659
Celobiose	0,923	1,182
Furfural	0,467	0,026
5-Hidroximetilfurfural	0,007	0,004
Ácido acético	0,077	0,045

Para cada ensaio de fermentação, o melaço diluído foi esterilizado juntamente com o leitor de pH e a cuba de vidro do reator através de vapor saturado a 121°C por 20 minutos em autoclave. Após esfriar, o inóculo foi vertido no reator, utilizando uma concentração de aproximadamente 10% em relação ao volume total de meio reacional, com a finalidade de reduzir a fase “lag” de crescimento durante o início do processo.

A fermentação foi conduzida em reatores Bioflo III de 2 L com um volume reacional fixo de 750 mL, a uma vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 34°C e agitação de 300 rpm. O controle de temperatura se deu por recirculação de água na parte externa da cuba encamisada e a agitação foi realizada com um sistema do tipo turbina de pás planas. O bioreator possui ainda medidores on-line de vazão de CO₂, pH e turbidez. A Figura 9.2 mostra o reator Bioflo III utilizado nos experimentos do processo contínuo.

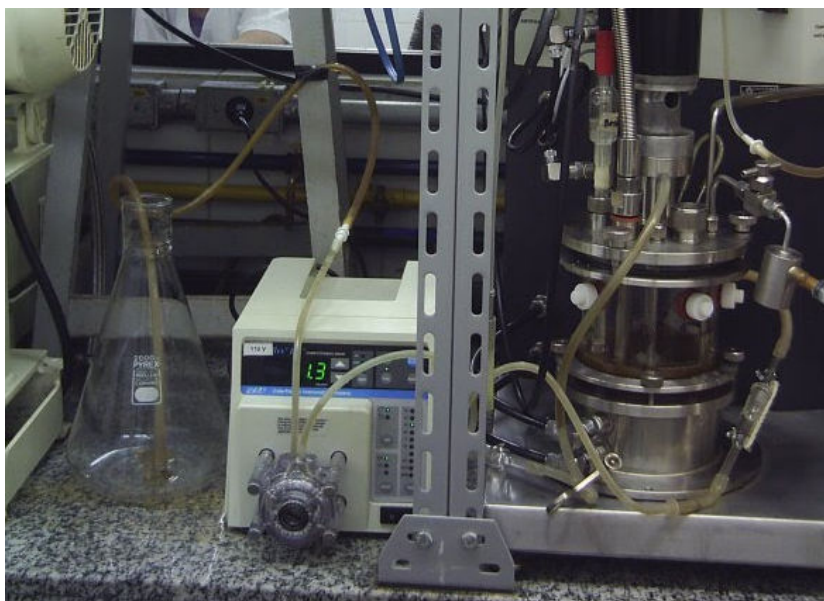


Figura 9.2: Fermentador Bioflo III operando em sistema contínuo.

Durante o processo de alimentação, o melaço diluído era esterilizado em frascos de vidro enquanto os hidrolisados eram submetidos a processos de filtração utilizando membrana de éster de celulose, com diâmetro de poro de 0,45 µm. Optou-se por este tipo de esterilização uma vez que com o aquecimento poderia haver a perdas evaporativas de compostos inibidores dos hidrolisados, principalmente o furfural e ácido acético.

As Tabelas 9.6 e 9.7 apresentam a composição do mosto da fermentação contínua utilizando, junto ao melaço, o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

Tabela 9.6: Composição do mosto de fermentação contínua utilizando o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Porcentagem de hidrolisado no mosto (% , m/m)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Ácido acético (g/L)	AF* (g/L)
0 (melaço puro)	0,000	0,000	0,000	54,414	12,198	7,152	0,000	0,000	0,000	76,485
5	0,046	0,955	0,000	54,666	12,786	8,712	0,003	0,072	0,125	78,897
15	0,138	2,866	0,000	49,074	15,612	8,538	0,006	0,012	0,169	75,678
25	0,231	4,777	0,000	42,414	19,500	11,388	0,006	0,012	0,216	75,423
35	0,323	6,688	0,000	48,804	22,356	12,510	0,008	0,018	0,352	86,110

AF: açúcares fermentescíveis

Tabela 9.7: Composição do mosto de fermentação contínua utilizando o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Porcentagem de hidrolisado no mosto (% , m/m)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Ácido acético (g/L)	AF* (g/L)
0 (melaço puro)	0,000	0,000	0,000	52,075	9,673	7,038	0,036	0,024	0,864	71,390
5	0,000	0,072	0,000	45,276	9,192	6,492	0,012	0,036	0,840	71,424
15	0,000	0,217	0,000	44,265	6,212	7,800	0,012	0,048	0,708	68,690
25	0,000	0,361	0,000	43,365	5,362	8,654	0,024	0,048	0,360	67,749
35	0,000	0,506	0,000	40,365	8,365	7,372	0,036	0,048	0,744	66,320
45	0,000	0,650	0,000	37,985	11,780	6,496	0,036	0,024	0,264	66,360
60	0,000	0,867	0,000	36,987	13,172	4,844	0,048	0,048	0,972	65,052

AF: açúcares fermentescíveis

Para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio a fermentação ocorreu com até 35% (m/m) de hidrolisado no mosto, diferentemente do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, onde foram realizadas alimentações com até 60% (m/m) deste hidrolisado. Esta diferença na alimentação foi devida ao fato de que a levedura, durante o processo de fermentação com hidróxido de cálcio, apresentou problemas de floculação celular ao final do processo de alimentação com 25% (m/m) de hidrolisado. Além disso, ao final da alimentação com 35% (m/m) foi observado o princípio de uma contaminação bacteriana.

A floculação ocorre devido a vários fatores dos quais se destacam o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias (SERRA *et al.*, 1979), contato entre bactérias indutoras da floculação e leveduras (YOKOYA e OLIVA NETO, 1991) ou ainda devido à contaminação por leveduras floculantes (STRATFORD, 1989 a, b).

Estudos mostram que o aumento dos íons cálcio no mosto pode acabar estimulando a floculação celular (NETO, 2008).

Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados, em todos os ensaios, e congeladas para posterior quantificação dos produtos e subprodutos, além da determinação de células totais e Brix.

9.3.3. Preparação do Mosto para o Processo em Batelada

Para a fermentação em batelada, foi utilizado o hidrolisado obtido após hidrólise em batelada alimentada como descrito na *seção 8.3.1.1*. Além disso, foi preparado um meio de glicose pura com concentração de aproximadamente 70 g/L, a fim de comparar os rendimentos estequiométricos dos hidrolisados com o rendimento deste meio sintético. A Tabela 9.8 apresenta a concentração de cada componente presente no mosto para o processo em batelada.

A fermentação de cada um dos meios fermentativos foi conduzida utilizando um volume reacional de 70,0 mL de cada hidrolisado e meio sintético. A fermentação foi realizada em shaker com a temperatura e agitação controladas a 34°C e 150 rpm. Os hidrolisados foram filtrados através de uma membrana de éster de celulose com diâmetro de poro de 0,45µm (esterilização a

frio) e antibióticos foram adicionados para evitar a proliferação de microrganismos. Os hidrolisados não foram esterilizados por meio de calor para não ocorrer perda dos inibidores voláteis.

Tabela 9.8: Concentração de cada componente presente no mosto do processo em batelada.

Concentração (g/L)	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio alcalino	Glicose pura
Celobiose	0,00	0,00	0,00
Glicose	62,33	67,74	72,78
Xilose	21,90	8,94	0,00
Arabinose	0,00	6,44	0,00
Glicerol	0,00	0,67	0,00
Etanol	0,20	0,02	0,00
5-Hidroximetilfurfural	0,00	0,012	0,00
Furfural	0,003	0,00	0,00
Ácido acético	4,02	2,96	0,00

Ao analisarmos a Tabela 9.8 observa-se que dentre os inibidores analisados o mais expressivo é o ácido acético, sendo observado uma maior concentração para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

9.3.4. Métodos analíticos

A concentração dos microrganismos foi determinada através da gravimetria (peso seco), e as concentrações de etanol, glicerol, açúcares e inibidores foram determinadas por cromatografia líquida. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 3300 rpm.

O sobrenadante foi separado para análise de açúcares, glicerol, etanol e inibidores, e o precipitado para determinação de massa seca.

9.3.4.1. Quantificação da Fração Líquida

O sobrenadante resultante da centrifugação do meio reacional foi diluído, filtrado com membrana microporo 0,45 µm e analisado como descrito na *seção 4.3.2.1*.

9.3.4.2. Determinação da Concentração de Células Totais

A análise gravimétrica de peso seco foi realizada após centrifugação da amostra e lavagem do precipitado por 2 vezes com água destilada. O material sólido foi então transferido para tubos de ensaio previamente pesados, que foram então levados para uma estufa de secagem à temperatura de 70°C, sendo mantido nesta até massa constante. O cálculo da concentração celular foi realizado de acordo com a Equação 9.2.

$$\text{Concentração de biomassa (g/L)} = \frac{(\text{massa tubo} + \text{material celular}) - \text{massa tubo vazio}}{\text{volume do líquido centrifugado}} \quad 9.2$$

9.4. Resultados e Discussões

9.4.1. Fermentação em Processo Contínuo

Visando analisar a influência do hidrolisado no processo fermentativo, principalmente relacionado ao efeito dos inibidores na levedura, foi apresentado nas Figuras 9.3 e 9.4 uma análise entre a concentração de etanol no vinho delevedurado, a concentração de células totais, os sólidos solúveis (Brix), a turbidez e o pH, para os hidrolisados do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

As caixas apresentada acima de cada figura indicam as concentrações de hidrolisados no mosto.

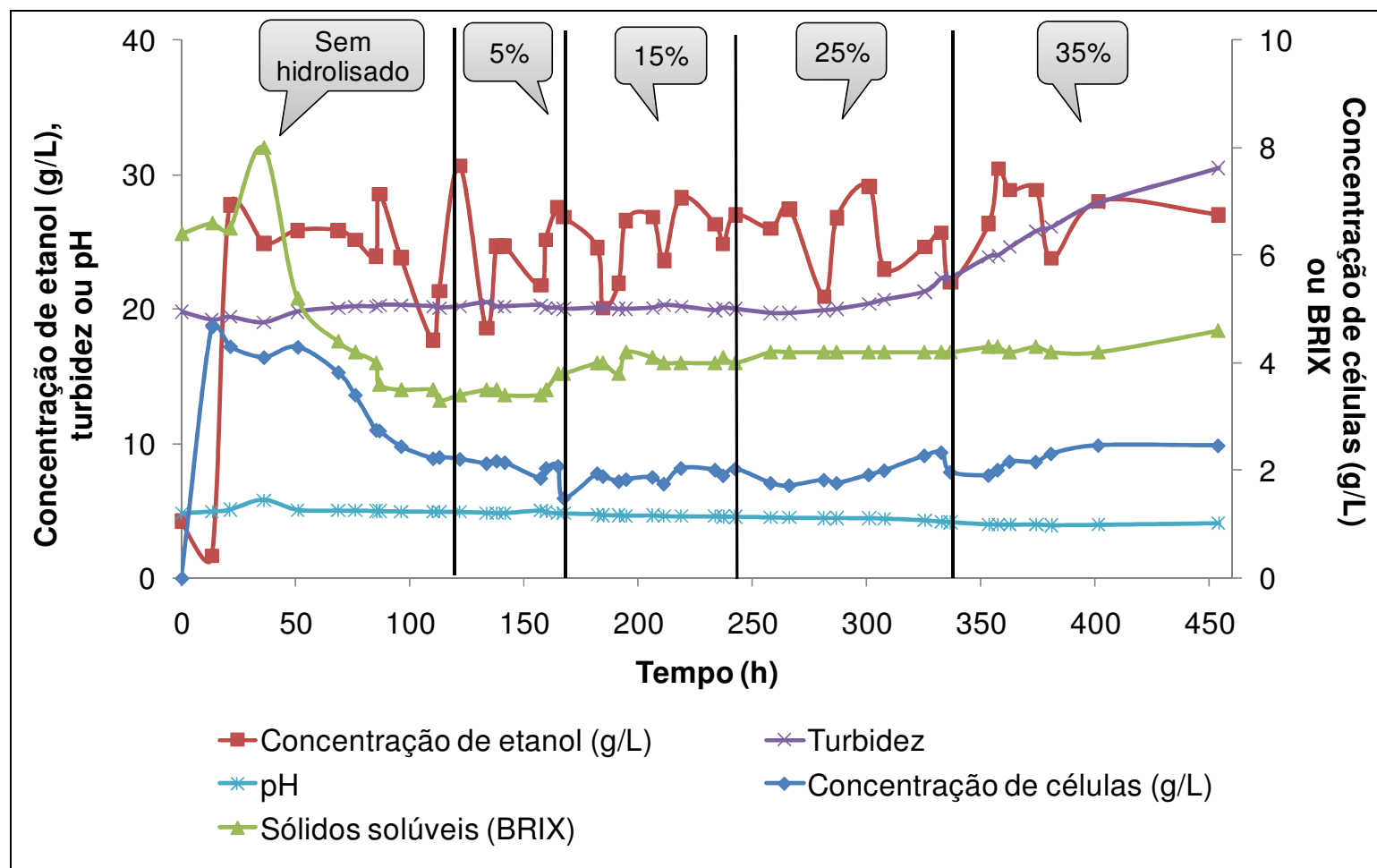


Figura 9.3: Medidas na fermentação contínua do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

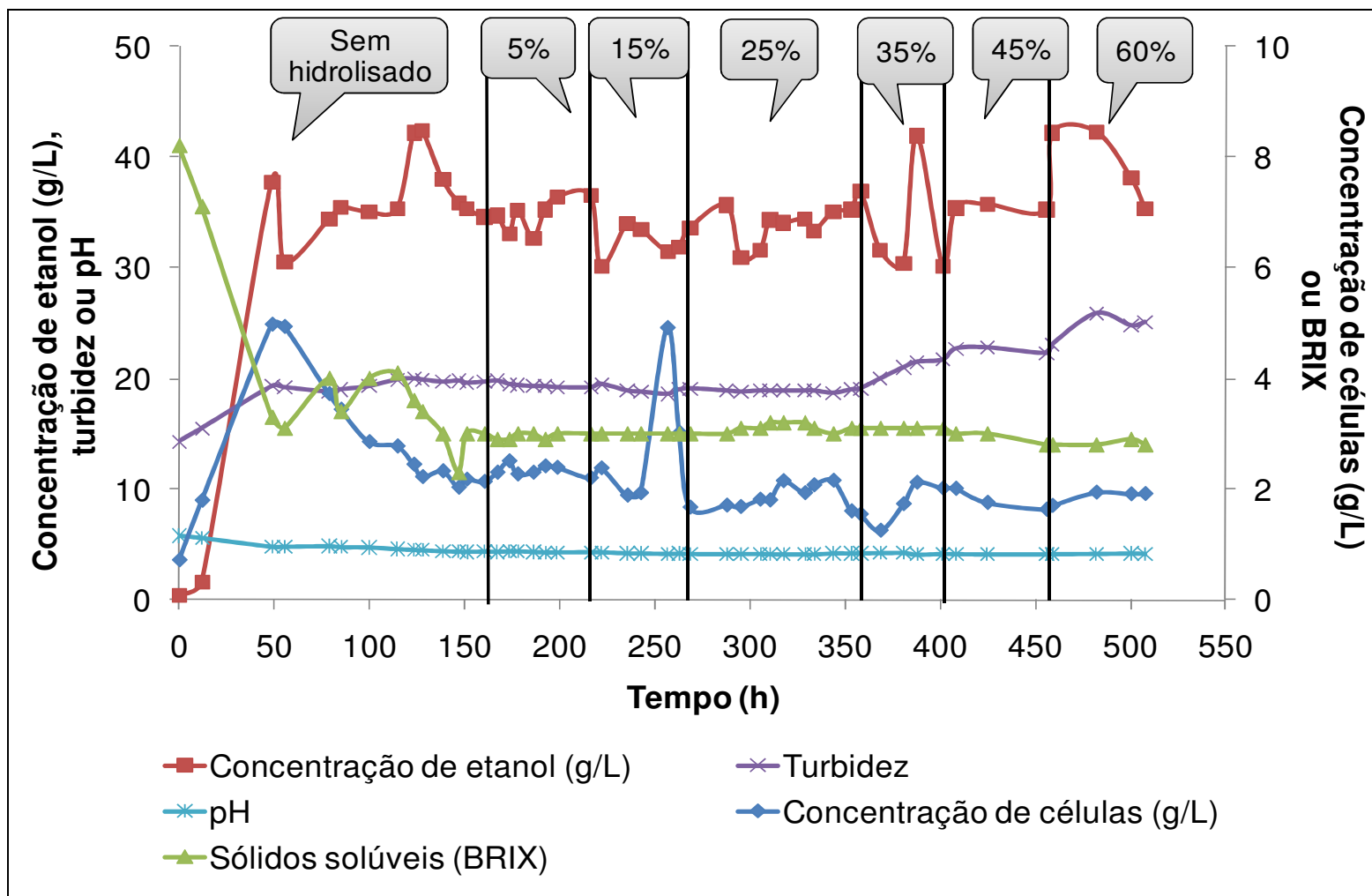


Figura 9.4: Medidas na fermentação contínua do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Analizando as Figuras 9.3 e 9.4 pode-se perceber que a levedura foi capaz de manter um nível relativamente constante de atividade de fermentação durante todo o curso experimento. Fatores como o pH e o Brix mantiveram-se praticamente constantes ao longo do processo fermentativo.

Observa-se ainda que para os dois pré-tratamentos, a partir da adição de 35% (m/m) de hidrolisado, observou-se um aumento da turbidez do mosto, sendo este mais considerável para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Neste momento foi observada a formação de pequenos flocos de levedura, além da observação de contaminação bacteriana deste mosto.

As Figuras 9.5 e 9.6 apresentam a evolução das concentrações dos principais substratos e produtos no vinho delevedurado para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. Analisando as Figuras 9.5 e 9.6 observa-se o fenômeno da diauxia, onde há um consumo preferencial de um substrato em relação aos demais. Observou-se que a glicose é preferencialmente metabolizada pelo microrganismo em relação à frutose, levando assim a um maior acúmulo desta dentro do reator.

Outro fator interessante observado é que a concentração de glicerol é praticamente constante ao longo do processo. Normalmente, o metabolismo de furfural e 5-hidroximetilfurfural estão diretamente associados com a formação do glicerol, ou seja, a concentração de glicerol aumenta com o aumento de inibidores na alimentação. Se existir uma baixa presença destes inibidores no hidrolisado ou a adição do hidrolisado ao melaço favorecer esta diminuição, a fermentação ocorrerá de forma convencional, sem prejuízo ao processo.

Analizando as Figuras 9.7 e 9.8 é fácil comprovar esta afirmação, já que a presença dos inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural é bem baixa. Estas figuras apresentam os compostos não fermentescíveis pela levedura *S. cerevisiae* ao longo do processo fermentativo, além dos inibidores provenientes principalmente dos hidrolisados.

Observa-se que a xilose e celobiose permaneceram praticamente constantes ao longo do processo fermentativo, variando claro, com o aumento da quantidade de hidrolisado adicionada ao melaço.

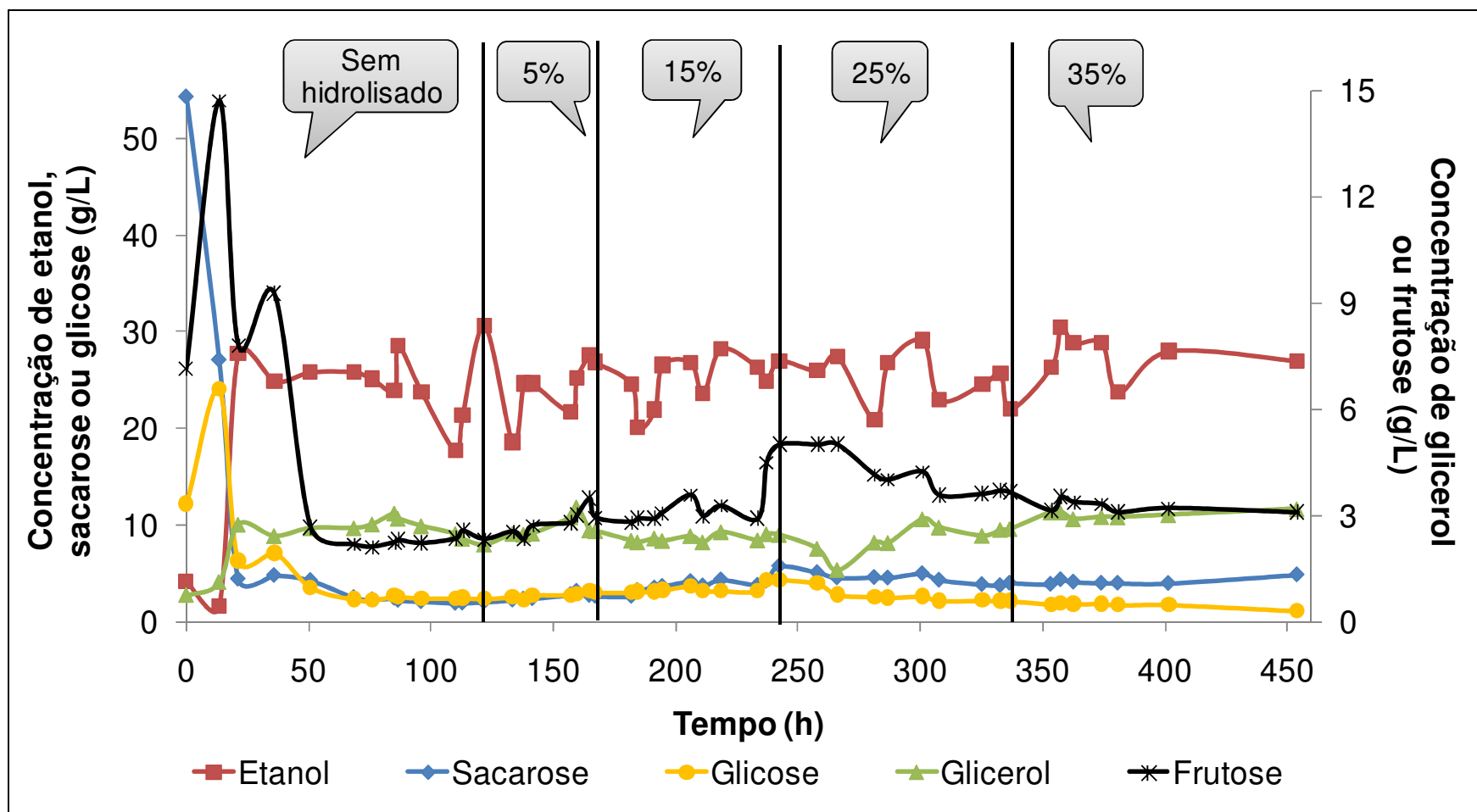


Figura 9.5: Composição do vinho delevedurado para os produtos e subprodutos da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

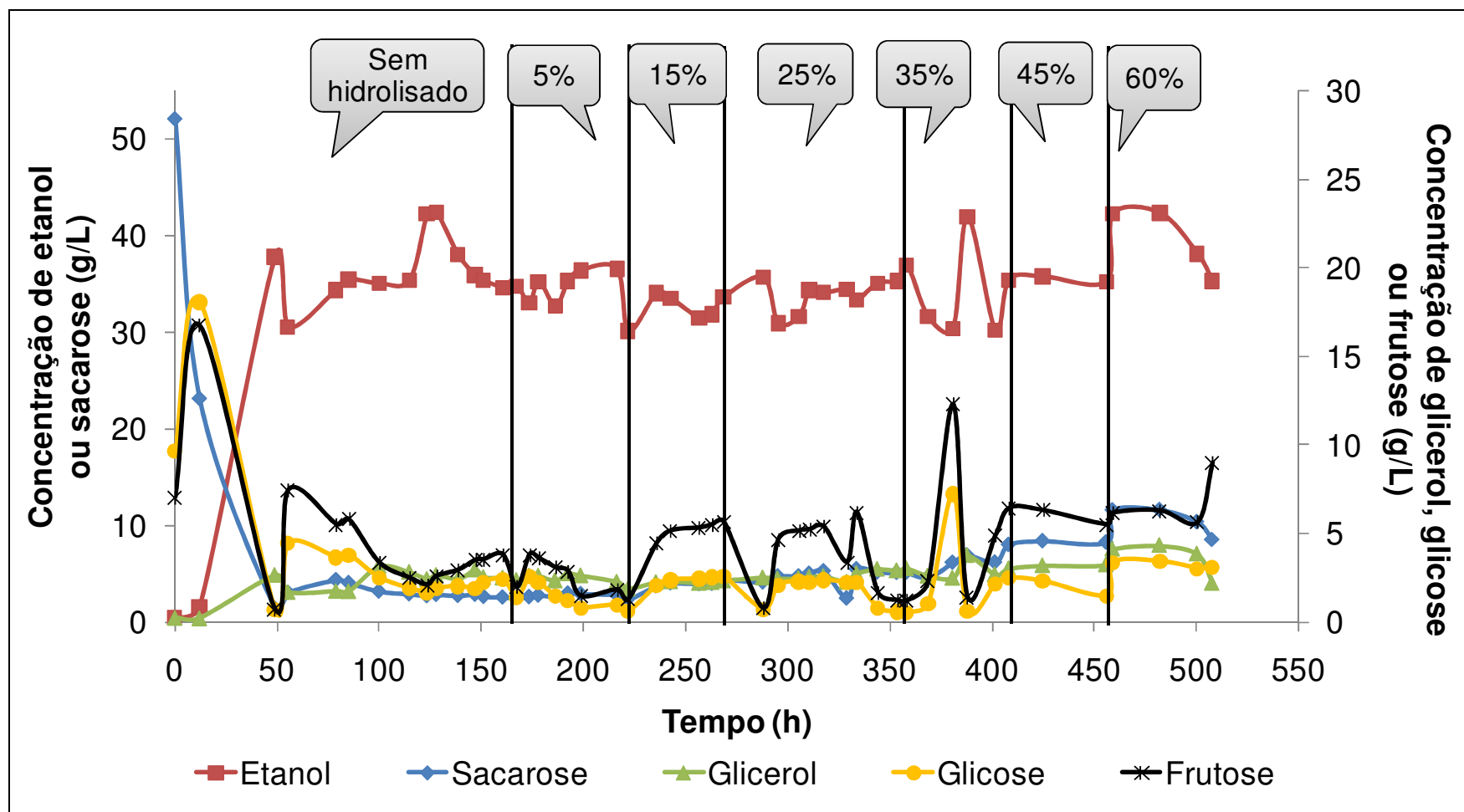


Figura 9.6: Composição do vinho delevedurado para os produtos e subprodutos da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

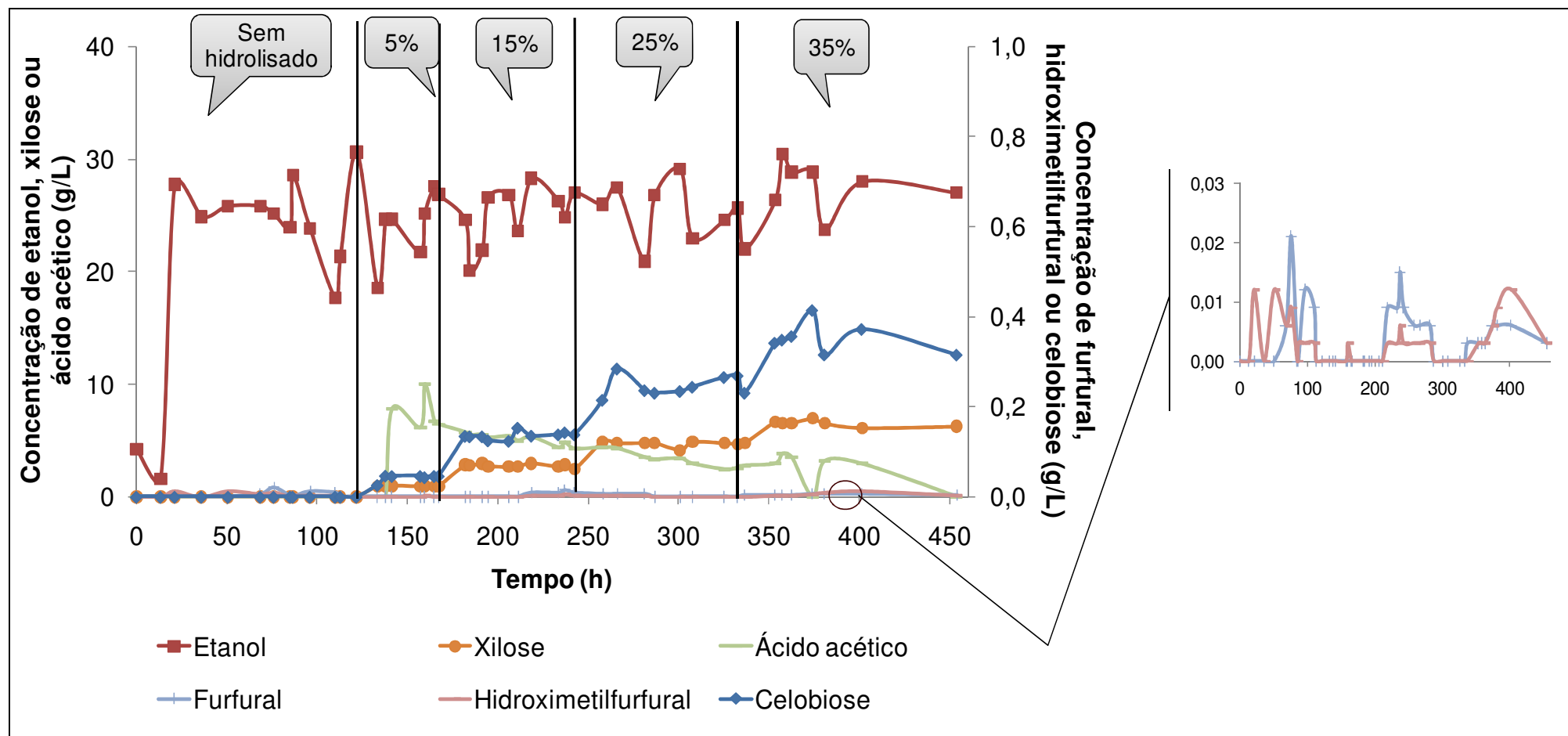


Figura 9.7: Composição do vinho de levedura para os compostos não fermentescíveis pela levedura *S. cerevisiae* e inibidores da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

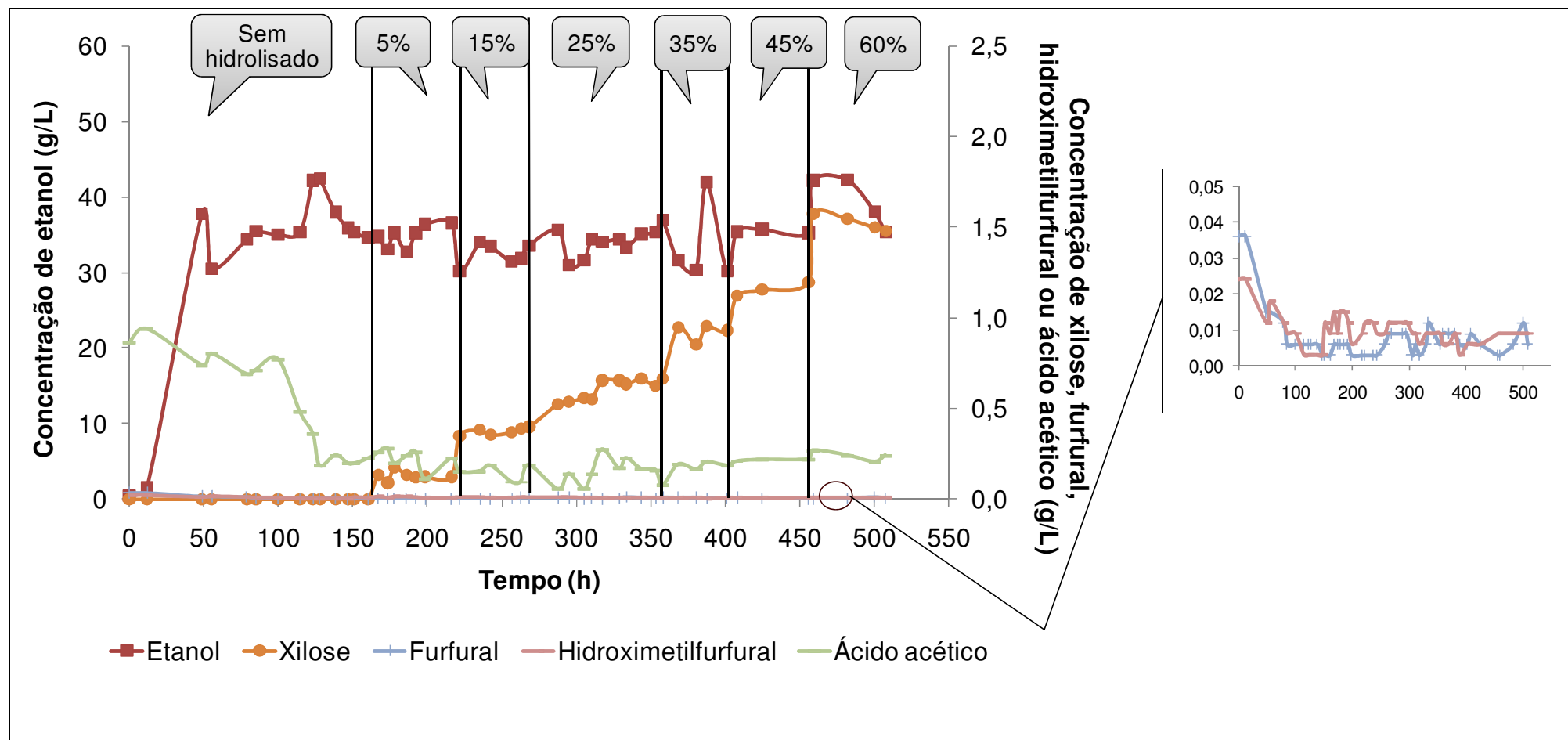


Figura 9.8: Composição do vinho delevedurado para os compostos não fermentescíveis pela levedura *S. cerevisiae* e inibidores da fermentação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Observa-se nas Figuras 9.7 e 9.8 que a quantidade dos inibidores analisados no mosto é muito baixa, mesmo considerando os pontos onde houve maior adição de hidrolisado. Para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio, foram observadas concentrações de 0,008 g/L de furfural, 0,018 g/L de 5-hidroximetilfurfural e 0,352 g/L de ácido acético quando 35% (m/m) de hidrolisado foram adicionados ao mosto. Já para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, obtiveram-se concentrações de 0,048 g/L de furfural e 5-hidroximetilfurfural e 0,972 g/L de ácido acético, com adição de 60% (m/m) de hidrolisado.

Segundo estudos realizados por DELGENES *et al.* (1996), concentrações de 2,0 g/L de furfural e 3,0 g/L de 5-hidroximetilfurfural levam a uma redução de 89% e 93% da produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae*. Ainda segundo os autores, concentrações de 10,0 g/L de ácido acético leva a uma redução de 27% da produção de etanol pela ação da mesma levedura.

Estudos realizados por PALMQVIST *et al.* (1999) mostraram uma redução da produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* de 79% quando o meio apresentava uma concentração de 4,0 g/L de furfural e PHOWCHINDA *et al.* (1995) observaram uma redução de 74% quando a concentração de ácido acético no meio era de 6,0 g/L.

Se compararmos estes resultados observados pelos autores com os resultados da concentração de inibidores no mosto para os hidrolisados de hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, nota-se que a concentração destes inibidores é muito baixa se comparada às concentrações encontradas pelos autores, sendo assim, dificilmente uma inibição seria observada nestes processos fermentativos.

Assim, observa-se que a adição do hidrolisado ao melaço, tanto para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio quanto peróxido de hidrogênio alcalino, não afetou o desempenho do processo fermentativo.

Ao final de cada alimentação com diferentes concentrações de hidrolisado no meio, amostras do mosto foram coletadas e adicionadas em lâminas juntamente com gotas de azul de metileno para observação no microscópio óptico. As Figuras 9.9 e 9.10 apresentam estas fotografias. Foi utilizado um aumento na lente objetiva de 50x e 100x de acordo com a necessidade de observação dos detalhes.

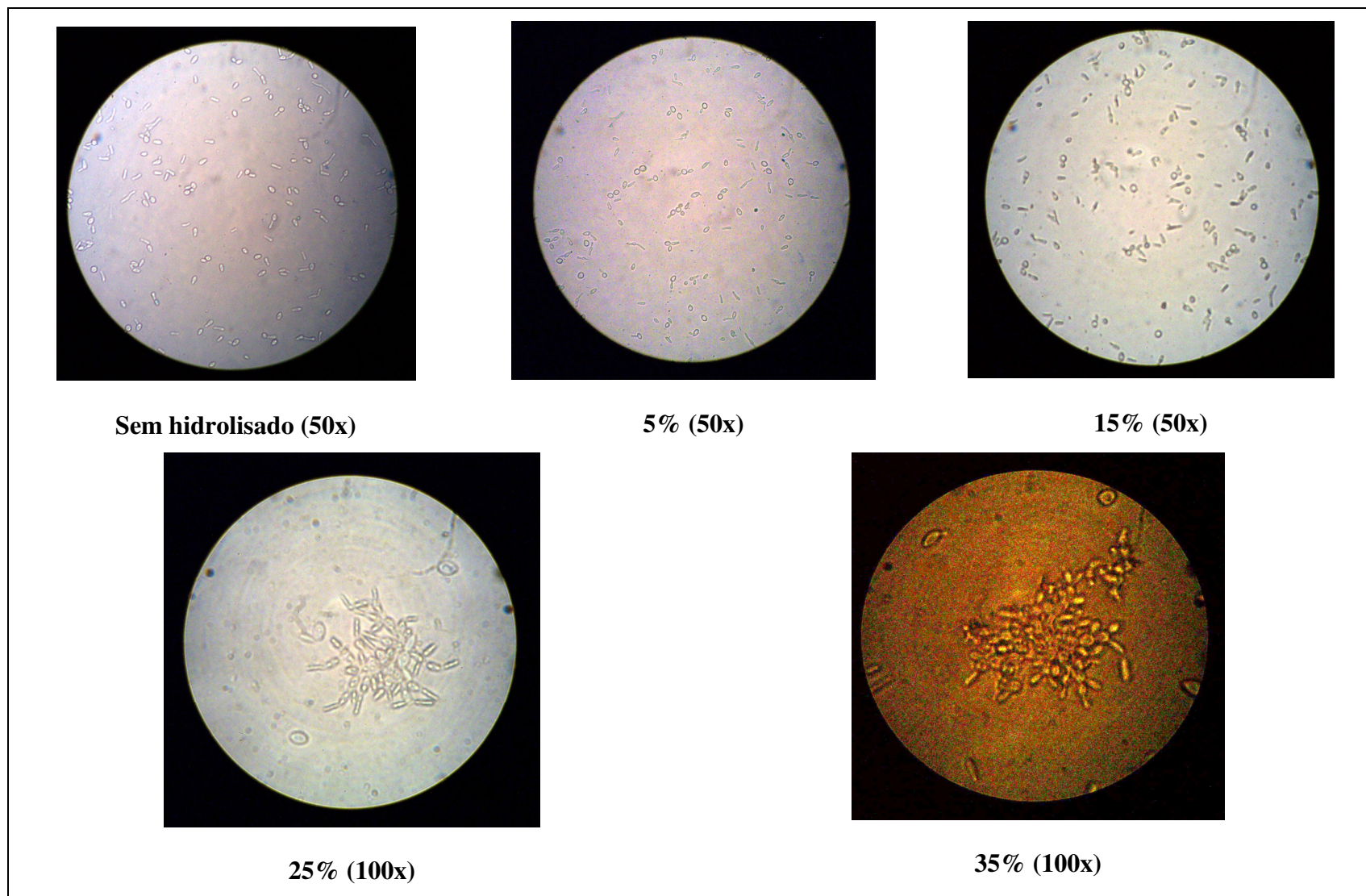


Figura 9.9: Microscopia óptica da levedura após a etapa de fermentação com a variação da concentração do hidrolisado de hidróxido de cálcio.

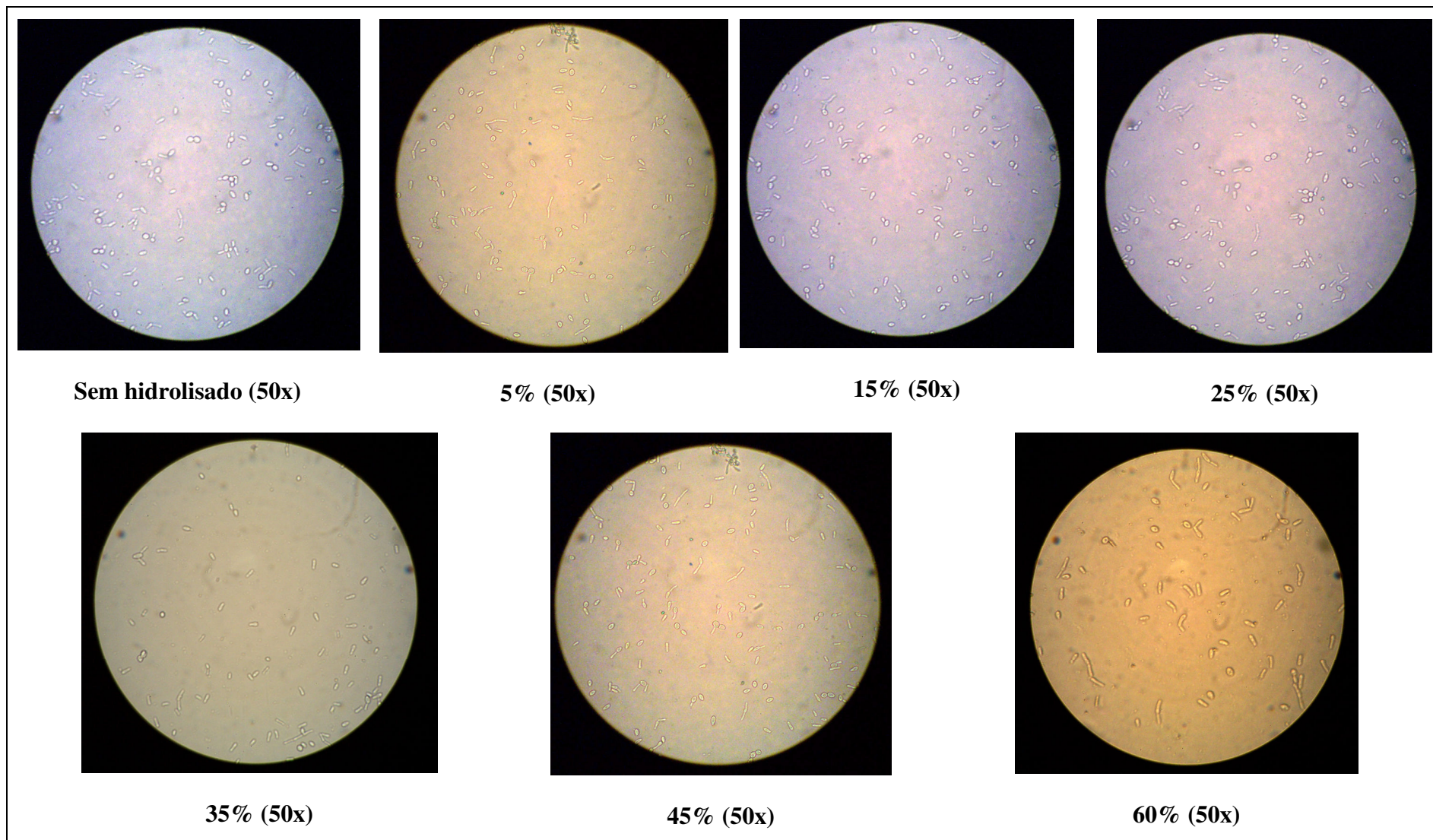


Figura 9.10: Microscopia óptica da levedura após a etapa de fermentação com a variação da concentração do hidrolisado de peróxido de hidrogênio alcalino.

Analizando a Figura 9.9 observou-se a floculação da levedura a partir da alimentação de 25% (m/m) de hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio ao melaço. A floculação, como dito anteriormente, é favorecida pela presença dos íons Ca^{2+} no meio juntamente com uma possível contaminação bacteriana.

Normalmente a levedura *S. cerevisiae* apresenta forma oval. No caso das micrografias da Figura 9.9 o que se observa a partir da adição de 15% (m/m) de hidrolisado é um alongamento da levedura. A alteração morfológica da levedura pode ser causada devido ao stress relacionado a falta de nutrientes minerais no meio, principalmente fósforo, magnésio, manganês e zinco, uma vez que a concentração de inibidores no meio é consideravelmente baixa. Segundo BASSO *et al.* (1996), deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais provocam alterações metabólicas bastante significativas.

Ainda na Figura 9.9 é possível observar a formação de pseudo-hifas, caracterizada por crescimentos filamentosos como resposta a uma deficiência de nitrogênio no meio o que acaba gerando uma queda de viabilidade da levedura.

No caso da Figura 9.10, relacionada as micrografias obtidas ao final de cada processo de alimentação do mosto com diferentes concentrações de hidrolisados obtidos após hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, não foi observado grandes variação na morfologia da célula. Além disso, a alteração na relação área/volume da levedura apresentou-se menor.

9.4.2. Fermentação em Batelada

Uma vez que os hidrolisados apresentam baixos índices de inibidores, ensaios em batelada foram realizados para mostrar a fermentabilidade destes meios. As Figuras 9.11, 9.12 e 9.13, apresentam os perfis de todos os componentes presentes ao longo da fermentação do meio sintético de glicose pura e para os hidrolisados obtidos por hidrólise em batelada alimentada do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

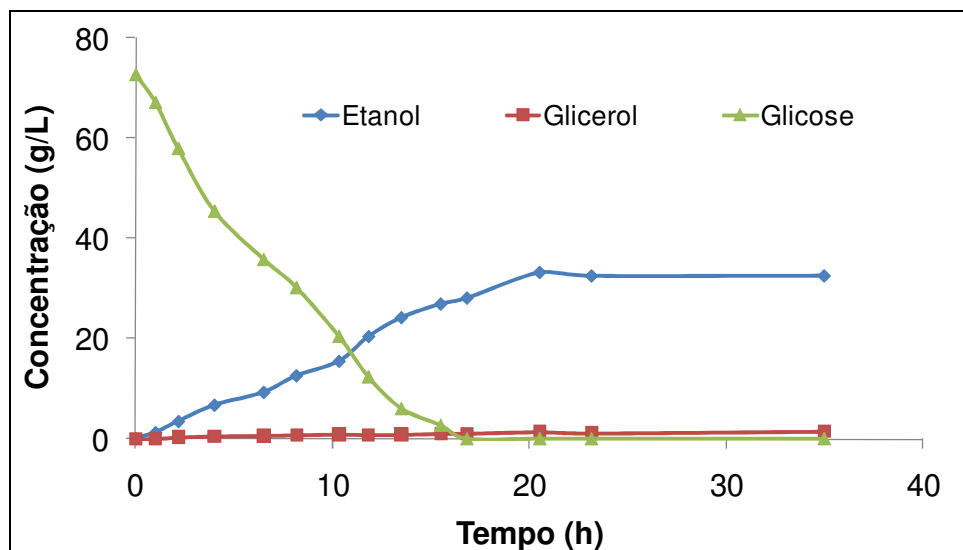


Figura 9.11: Fermentação em batelada para a glicose pura.

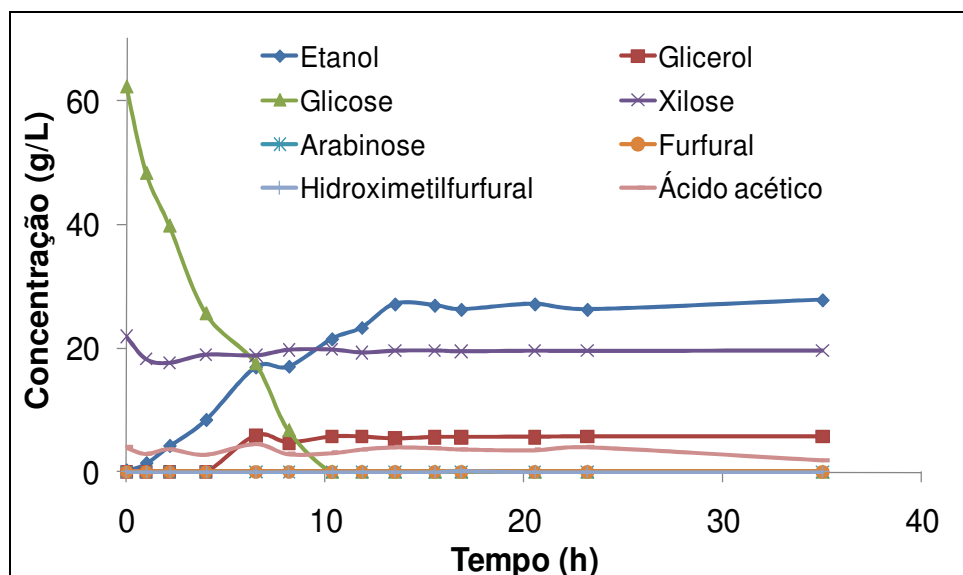


Figura 9.12: Fermentação em batelada para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

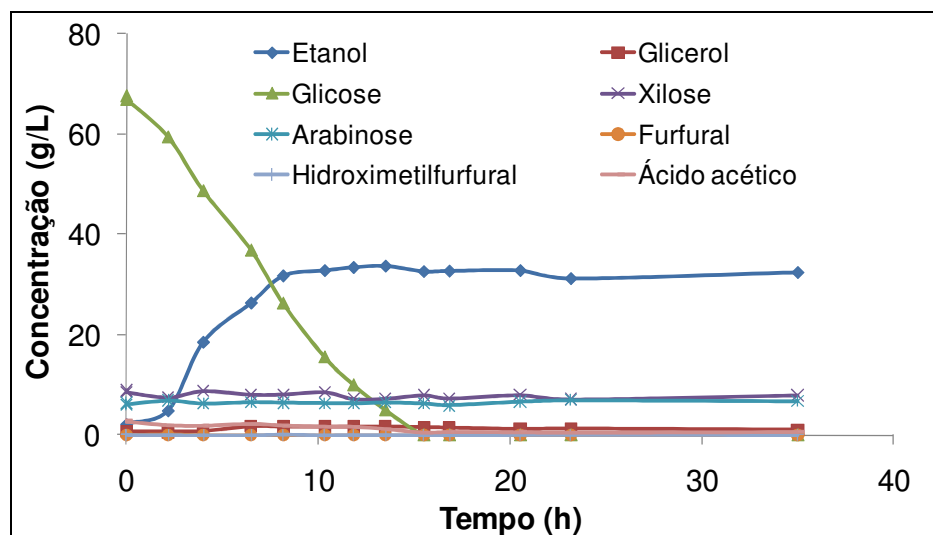


Figura 9.13: Fermentação em batelada para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

A Figura 9.14 mostra uma comparação entre os perfis de fermentação em batelada, priorizando apenas o substrato e os produtos principais do processo.

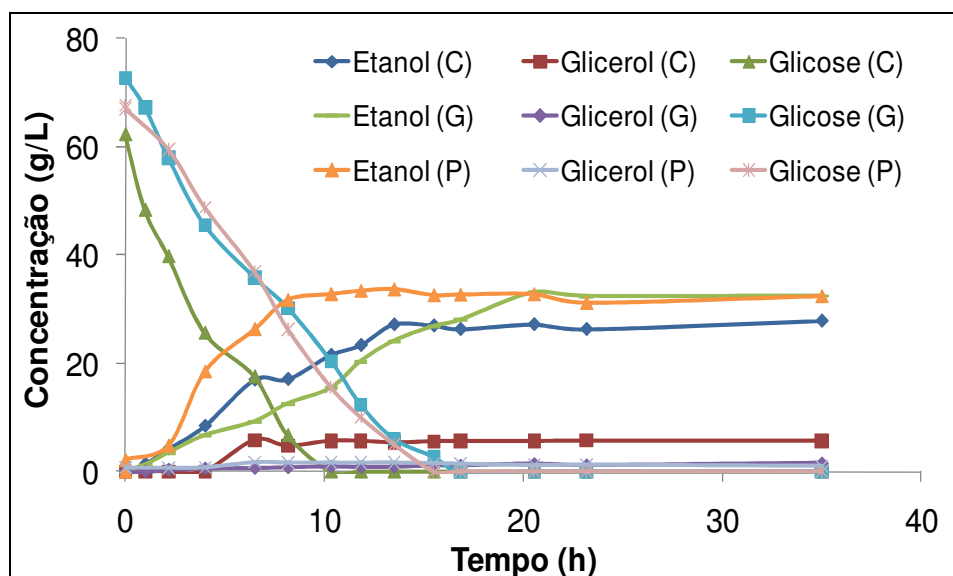


Figura 9.14: Comparação entre os perfis fermentativos. Na legenda (C) corresponde ao hidrolisado de bagaço pré-tratado com cal, (G) à glicose e (P) ao hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido.

Comparando o perfil da Figura 9.14 para a fermentação dos hidrolisados e da glicose pura em processo batelada não foram observados problemas de fermentabilidade do hidrolisado. Isso se deve ao fato principalmente do hidrolisado apresentar baixa concentração de inibidores, como pode ser visualizado na Figura 9.12, para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e na Figura 9.13, para o hidrolisado pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Além da baixa presença de inibidores, outro fator que pode ter favorecido a fermentação foi o enriquecimento do mosto com os nutrientes adicionados ao meio de cultura durante a etapa de crescimento da levedura. Sendo assim, sugere-se um estudo mais consistente através da lavagem da levedura para retirada destes nutrientes afim de que estes não favoreçam o processo.

Observa-se ainda uma concentração de etanol produzido é ligeiramente menor para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Este resultado está apenas relacionado com a menor concentração de glicose neste hidrolisado se comparado com a concentração dos outros meios, como mostrado na Tabela 9.8. Isso pode ser confirmado analisando a Figura 9.15 que mostra os rendimentos ao longo de cada processo fermentativo. O rendimento das fermentações foi calculado através da Equação 9.3.

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\Delta P}{\Delta S \times 0,511} \times 100 \quad 9.3$$

Onde:

ΔP : variação da concentração do produto (etanol), g/L

ΔS : variação da concentração do substrato (glicose), g/L

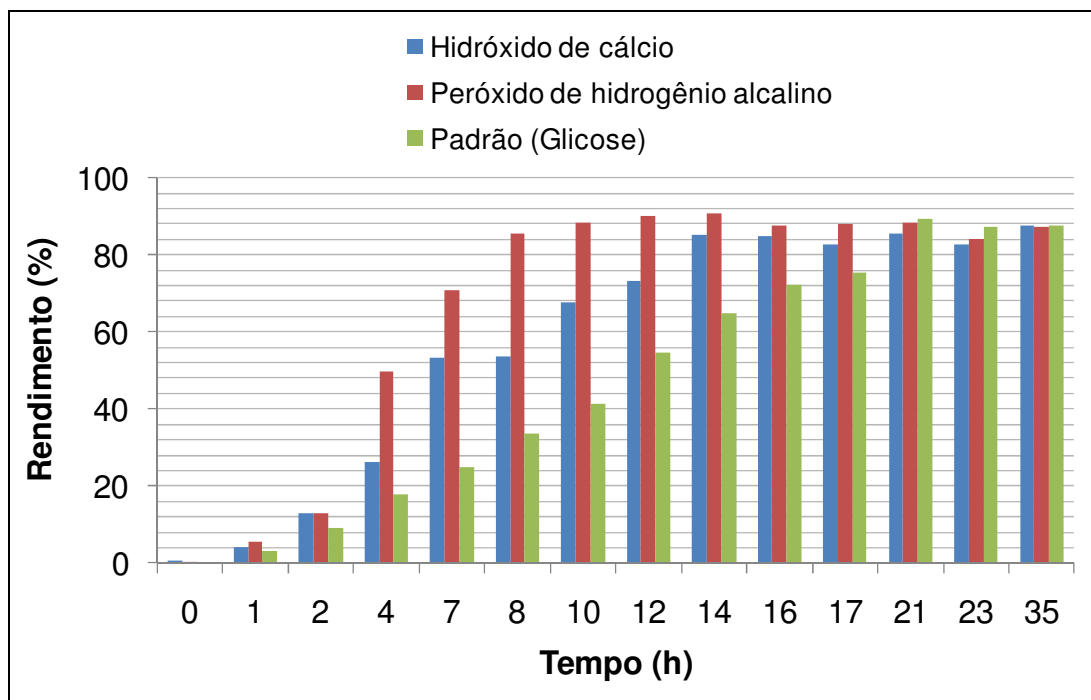


Figura 9.15: Rendimento ao longo do processo de fermentação para cada meio.

Analisando a Figura 9.15 observa-se que os rendimentos ficaram próximos a 90%, valor semelhante ao rendimento do meio industrial. Foram encontrados rendimentos finais de 89,2% para o meio sintético de glicose, 87,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e de 88,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

9.5. Conclusões

Neste capítulo foram estudadas as fermentações dos hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática, nas condições otimizadas, do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, também nas condições otimizadas. Efetuaram-se os estudos em modo batelada e contínuo, visando à avaliação da influência dos inibidores nesta etapa. No processo contínuo, optou-se por adicionar o hidrolisado, em diferentes concentrações, ao melaço industrial, objetivando assim uma integração do processo fermentativo convencional com o processo de

etanol lignocelulósico.

Os resultados mostraram que para o processo de fermentação contínua a levedura foi capaz de manter um nível relativamente constante de atividade de fermentação durante todo o curso do experimento. Observou-se ainda que fatores como o pH e o Brix mantiveram-se praticamente constantes ao longo do processo fermentativo.

Foi observado ainda, durante o processo de fermentação contínua, que as concentrações de glicerol para os ensaios com o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino permaneceram praticamente constantes ao longo do processo, e isto está diretamente relacionado à baixa presença de inibidores nos hidrolisados.

Em relação ao processo em batelada, os resultados mostram que foi possível fermentar os hidrolisados puros sem que houvesse perdas de fermentabilidade por parte da levedura. Rendimentos finais de 89,2% foram encontrados para a fermentação do meio sintético de glicose, de 87,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e de 88,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Com tudo isso foi possível observar a total viabilidade do hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino quanto a sua fermentabilidade.

CAPÍTULO 10

PROPOSTAS PARA UTILIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DOS PROCESSOS

Neste capítulo são apresentadas propostas para a utilização dos resíduos da etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Foi proposta uma separação do licor de pré-tratamento visando a obtenção, na fração solúvel, principalmente dos açúcares não fermentescíveis pela levedura *S. cerevisiae* e na fração insolúvel, a lignina precipitável. Para o resíduo obtido após etapa de hidrólise enzimática e para a fração líquida do licor de pré-tratamento, a proposta foi a produção de biogás. A lignina foi analisada quanto a possibilidade de recuperação e entalpia. O objetivo, nos dois casos, é utilizar o biogás produzido e a lignina precipitável na queima direta em caldeias para geração de energia para o processo produtivo. Os estudos relacionados à produção de biogás foram efetuados no *Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement* do *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) em Narbonne - França, sob supervisão da Dra. Hélène Carrère.

10.1.Introdução

Durante a produção de etanol de segunda geração existe a geração de uma grande quantidade de águas residuais, como o licor de pré-tratamento, rico em pentoses; a lignina solúvel e insolúvel, e a vinhaça; além de eventuais resíduos sólidos resultantes após a etapa de hidrólise enzimática, constituído principalmente de lignina e hemicelulose não hidrolisáveis.

Um dos importantes desafios da produção do etanol lignocelulósico é a utilização de todos os resíduos de processo, visando uma perfeita integração energética, maximizando o valor

econômico da biomassa, reduzindo o desperdício e se tornando um importante instrumento de mitigação de emissões dos gases do efeito estufa. Assim, é de suma importância que estes resíduos sejam aproveitados, o que acarretará em uma maior viabilização do processo produtivo.

Uma alternativa interessante para a utilização dessas águas residuais se dá através da produção de biogás por biodigestão anaeróbia, sendo o biogás produzido utilizado na queima direta em caldeiras para geração de energia.

A digestão anaeróbia é o processo de decomposição da matéria orgânica por um conjunto de microrganismos em um ambiente livre de oxigênio (PAIN e HEPHERD, 1985). Trata-se de um processo natural que ocorre em ambientes atóxicos, incluindo, dentre uma vasta gama de matérias-primas, os resíduos industriais e agrícolas. A produção de biogás através da digestão anaeróbia oferece significativas vantagens sobre outras formas de tratamento de resíduos, destacando:

- Uma menor quantidade de lodo é produzida se comparada com outras tecnologias de tratamento aeróbio,
- A técnica é bem sucedida no tratamento de resíduos úmidos inferiores a 40% de matéria seca (MATA-ALVAREZ, 2002),
- Bastante eficaz na remoção de patógenos (BENDIXEN, 1994; LUND *et al.*, 1996; SAHLSTROM, 2003).
- Mínima emissão de odores, já que 99% dos compostos voláteis são oxidativamente decompostos durante a combustão, como por exemplo, o H₂S e o SO₂ (SMET *et al.*, 1999).
- O lodo produzido apresenta um poder de fertilização maior em termo de disponibilidade dos compostos para as plantas (TAFDRUP, 1995),
- Uma fonte de energia neutra em carbono é produzida sob a forma de biogás, podendo obter-se créditos de carbono através da sua produção e utilização como forma de energia limpa.

As ligninas obtidas industrialmente podem ser utilizadas de diversas formas: como agente dispersante em tintas, pesticidas, inseticidas, aditivos para tintas e vernizes, como agente para melhorar a viscosidade dos lodos na perfuração de poços petrolíferos e artesianos, como

agente aglomerante ou de flutuação no tratamento de efluentes, aditivo para melhoramento e acondicionamento de solos, como agente de liberação lenta de nitrogênio no solo, entre tantas outras aplicações (BELGACEM *et al.*, 2004; GARCÍA *et al.*, 1984; GONÇALVES e BENAR, 2001; KUBO e KADLA, 2004; SENYO *et al.*, 1996).

Para cada utilização, é necessário um certo tipo de processamento para obtenção de uma lignina específica, adequada para o processo proposto. Em se tratando da usina de cana-de-açúcar, a opção mais interessante é utilizar a lignina na produção de calor/energia através da sua queima direta em caldeiras, sendo integrada assim ao processo produtivo.

10.2.Materiais

10.2.1.Reagentes e Outros Materiais de Consumo

A Tabela 10.1 apresenta os reagentes utilizados para obtenção dos licores de pré-tratamento e de hidrólise, além dos reagentes necessários para as análises de produção de biogás.

Além dos reagentes, foi utilizado o KIT Spectroquant®, para determinação da DQO (Demanda Química de Oxigênio) das amostras, e o lodo ativado utilizado para a produção de biogás, obtido de um digestor anaeróbio mesofílico de uma fábrica de açúcar em Marselha, França.

Padrões de ácido acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico também foram utilizados para quantificação destes compostos nos licores de pré-tratamento.

Para análise da composição química dos resíduos sólidos de hidrólise, utilizaram-se sacos de nylon da marca Gerhardt.

Tabela 10.1: Reagentes utilizados para etapa de pré-tratamento, separação da lignina e nos experimentos de produção de biogás.

Reagentes	
Ácido bórico	Cloreto de magnésio hexahidratado
Ácido clorídrico	Cloreto de manganês tetra hidratado
ácido etil-2-butírico	Cloreto de níquel tetra hidratado
Ácido etilendiaminotetraacético	Cloreto de zinco
Ácido fosfórico	Dodecil sulfato de sódio
Ácido sulfúrico	Hidrogenofosfato de sódio penta hidratado
Antrona	Hidrogenofosfato de potássio
Bicabornato de sódio	Hidróxido de cálcio
Brometo de hexadeciltrimetilamônio	Hidróxido de sódio
Cloreto de amônio	Molibdato do sódio di hidratado
Cloreto de cálcio di hidratado	Peróxido de hidrogênio
Cloreto de cobalto hexa hidratado	Selenito de sódio
Cloreto de cobre di hidratado	Sulfeto de sódio nona-hidratado
Cloreto ferroso tetra hidratado	Tetraborato de sódio

10.2.2.Equipamentos

Nesta etapa, os seguintes equipamentos foram utilizados:

- Balança analítica;
- Banho termostático a 98°C;
- Calorímetro DSC Mettler-Toledo FP9 com detector DSC 50;
- Centrífuga Modelo NT 810 da marca Nova Técnica;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC14 equipado com condutividade térmica (TCD célula tipo de bloco P 100 ohm), integrator Shimadzu CR8A e Coluna CTR I;
- Cromatógrafo a gás Varian 3900 com auto amostrador CP 8400 e software GalaxyTM;
- Cromatógrafo Líquido HP-SEC da marca Shimadzu equipado com bomba (modelo LC-10AD); controlador de sistema (modelo SCL-10 A); detector de índice de refração diferencial (modelo RID 6 A); detector espectrofotométrico UV-Visível (modelo SPD-10AV); forno para

coluna (modelo CTO-10 A); processador de dados - Cromatopac (modelo C-R7AE) e injetor de amostras/20 μ L – Rheodyne (modelo 7125);

- Destilador de água;
- Espectrofotômetro HACH DR/2000;
- Estufa de secagem;
- Extrator de fibra da marca Gerhardt composto por a placa de aquecimento, béquer de 1000 mL, pérolas de vidro, carrossel de 6 lugares, sacos especiais tipo 1 para Van Soest da marca Gerhardt e sistema de refrigeração por reciclo;
- Gasômetro para medida do volume de biogás;
- Medidor de pH;
- Mufla;
- Placa de agitação;
- Placa de mineralização;
- Reatores encamisados conectados ao banho de óleo com temperatura máxima de 120°C;
- Sistema para purificação de água Milli-Q®.

10.3.Procedimento Experimental

10.3.1.Produção de Biogás

10.3.1.1.Obtenção dos Licores de Pré-Tratamento

Os licores foram obtidos após pré-tratamento do bagaço de cana com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, variando a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, como descrito na *seção 6.3.1*.

Ao término da reação, a lignina foi precipitada utilizando uma solução de ácido clorídrico 1% (v/v) até pH 2 (NASCIMENTO *et al.*, 1998). A precipitação por ácido clorídrico foi realizada apenas no estudo de produção de biogás, já que o ácido sulfúrico, normalmente utilizado para este fim por proporcionar melhores rendimentos, não pode ser utilizado, pois a presença do íon SO_4^{-2} afeta negativamente o processo produtivo do biogás.

Outra forma para a precipitação da lignina, também apresentando altos rendimentos, é através da adição de ácido acético 20% (v/v) até pH 3, sob agitação constante (GONZALEZ *et al.*, 2007). Sabe-se que para a produção de biogás o ácido acético afeta positivamente, sendo este consumido pelas bactérias metanogênicas e convertido a metano e gás carbônico.

Assim, para não haver interferência no processo de produção de biogás, mesmo não atingindo altos rendimentos, optou-se pela precipitação da lignina utilizando uma solução de ácido clorídrico 1% (v/v).

Após precipitação, o licor foi centrifugado a 3000 rpm e a fração líquida reservada para produção de biogás.

10.3.1.2. Obtenção dos Resíduos de Hidrólise Enzimática

Foi utilizado para este estudo apenas o resíduo restante após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado e hidrolisado nas condições ótimas. Assim, o resíduo para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio foi obtido após pré-tratamento de 4% (m/v) de sólidos nas condições otimizadas de pré-tratamento, como descrito na *seção 5.4.2.2*, e após hidrólise enzimática com 3% (m/v) de sólidos nas condições otimizadas, como descrito na *seção 7.4.4*. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, foi utilizado no pré-tratamento uma concentração de sólidos de 4% (m/v), como descrito na *seção 5.4.3*, e posterior hidrólise enzimática com 3% (m/v) de sólidos nas condições otimizadas, como descrito na *seção 7.4.4*.

Após pré-tratamento e hidrólise o resíduo foi lavado e seco a 105 °C para posterior utilização para produção de biogás.

10.3.1.3. Análise dos Licores de Pré-Tratamento e Resíduos Sólidos de Hidrólise

10.3.1.3.1. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é um parâmetro que mede a quantidade de matéria orgânica suscetível a ser oxidada por meios químicos que existem em uma amostra líquida ou sólida. Para tanto, utiliza-se um agente químico, o qual sob condições específicas causará a oxidação da matéria orgânica, biodegradável ou não. A partir da quantidade de reagente químico gasto na oxidação determina-se a quantidade de matéria orgânica e a partir desta, a quantidade de O₂ dissolvido por litro de solução.

No caso da determinação do índice de DQO de um efluente, o valor obtido indicará a quantidade de oxigênio, em gramas, que um litro deste efluente consumirá de um corpo d'água receptor se toda a matéria orgânica presente neste for mineralizada. Por esta razão, a DQO é um parâmetro muito usado para estimar o potencial poluidor de efluentes domésticos e industriais, ou seja, o impacto causado por estes efluentes sobre os ecossistemas aquáticos (HANSON, 1992).

Para a determinação da DQO nas amostras do licor de pré-tratamento e nos resíduos sólidos de hidrólise, foram utilizados kits comerciais que realizam a análise baseados na oxidação da amostra através de uma solução sulfúrica aquecida de dicromato de potássio, utilizando sulfato de prata como catalisador. O *apêndice XII* descreve toda a metodologia para esta análise, que foi realizada em triplicata.

10.3.1.3.2. Determinação da Matéria Seca (MS) e Matéria Orgânica (MO)

As matérias seca e orgânica foram determinadas para cada um dos resíduos sólidos e para o inóculo (lodo). A metodologia para análise pode ser observada no *apêndice XIII*. As análises foram realizadas em triplicata e estes valores obtidos foram utilizados para determinar a quantidade de material sólido e lodo a ser adicionado ao biodigestor sem causar prejuízos ao processo.

10.3.1.3.3.Determinação e Quantificação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV)

Os ácidos graxos voláteis foram quantificados nas amostras de licores de pré-tratamento por cromatografia gasosa. A metodologia para esta análise foi descrita no *apêndice XIV*. Sabe-se que os ácidos graxos são facilmente digeridos pelas bactérias acetogênicas, levando à produção de biogás.

10.3.1.3.4. Quantificação dos Açúcares por Antrona

A antrona (9,10-dihidro-9-cetoantraceno) é um reagente químico que forma um composto verde quando reage em meio ácido (ácido sulfúrico) com carboidratos e sacarídeos, especialmente os açúcares e amidos, produzindo um derivado de furano que tem o seu máximo de absorção em 620 nm.

Os açúcares presentes no licor de pré-tratamento foram quantificados pela reação direta com uma solução de antrona em meio ácido. A metodologia para esta análise foi descrita no *apêndice XV*. Os açúcares presente no licor de pré-tratamento são degradados pelas bactérias hidrolíticas produzindo assim o biogás.

10.3.1.3.5.Determinação da Composição Química do Resíduo Sólido

A composição química dos resíduos de hidrólise foi determinada de acordo com o método de VAN SOEST (1963), adaptado por DORLEANS (1998) e BUFFIERE e LOISEL (2007). Esta técnica de via úmida é considerada a de maior precisão para determinar os constituintes da parede celular dos vegetais.

O *apêndice XVI* apresenta a metodologia para esta análise.

10.3.1.4.Preparação dos Reatores de Biodigestão Anaeróbia

Os licores de pré-tratamento e o resíduo sólido do processo de hidrólise enzimática

foram adicionados aos reatores de 100 mL, utilizando um volume útil de 70 mL. Em cada reator foi adicionada, ainda, uma solução de macroelementos, fonte de N, P, Mg, Ca, K, etc; solução de oligoelementos, solução tampão bicarbonato de sódio e lodo ativado.

A Tabela 10.2 apresenta a concentração das soluções de macroelementos, sulfeto de sódio, oligoelementos e tampão utilizados para preparo do meio para produção de biogás.

Tabela 10.2: Concentração das soluções utilizadas como fonte de compostos inorgânicos para a produção de biogás.

Solução mãe de macroelementos	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	26,6
KH ₂ PO ₄	10
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	6
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	3
Solução de Na₂S, 9 H₂O	Concentração (g/L)
Na ₂ S, 9 H ₂ O	40
Solução mãe de oligoelementos	Concentração (g/L)
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	2
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,5
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,1
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,1
ZnCl ₂	0,05
H ₃ BO ₃	0,05
Na ₂ SeO ₃	0,05
CuCl ₂ , 2 H ₂ O	0,04
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,01
Tampão bicarbonato	Concentração (g/L)
NaHCO ₃	50

Após a preparação dos reatores, o meio teve o pH medido e caso necessário, este era ajustado para 7,0-7,4 (pH ótimo para biodigestão) com ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.

Os reatores foram submetidos à desgaseificação com nitrogênio, a fim de se obter uma condição anaeróbia do meio, posteriormente fechados e lacrados, sendo assim incubados em uma

câmara com temperatura controlada de 35°C e sem agitação. Optou-se por realizar os experimentos sem agitação para minimizar os custos do processo em relação ao gasto energético. Os ensaios foram realizados em triplicata.

10.3.1.5. Volume e Composição do Biogás Produzido

O volume de biogás produzido foi, de tempos em tempos, medido através do deslocamento vertical da água em um gasômetro. A metodologia para esta análise foi descrita no *apêndice XVII*. Após medição do volume produzido, os reatores eram submetidos a uma análise cromatográfica para determinação da porcentagem de cada gás presente no biogás produzido, como mostra a metodologia descrita no *apêndice XVIII*.

A medição do volume de biogás e sua composição foram realizadas até o momento em que não se observou mais a produção do mesmo.

10.3.2. Aproveitamento da Lignina

10.3.2.1. Obtenção da Lignina Precipitada

Os licores de pré-tratamento do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino com 4% (m/v) de sólidos (condição ótima) foram tratados com ácido sulfúrico 1,0 mol/L até pH 2, visando a precipitação da lignina (GONÇALVES *et al.*, 2002; KIM *et. al.*, 1987).

Após precipitação, a lignina foi lavada com água, para retirada dos resíduos de açúcar, seca a temperatura ambiente e posteriormente submetida a análises quanto ao teor de umidade, poder calorífico e massa molar média.

10.3.2.2. Determinação do Teor de Umidade

A lignina obtida após cada pré-tratamento foi analisada quanto ao teor de umidade,

como descrito no *apêndice I*. Segundo VALE *et al.* (2003), o poder calorífico, o teor de umidade e a densidade são as propriedades mais importantes a serem determinadas para utilização do material como combustível.

10.3.2.3.Determinação da Entalpia

A lignina foi submetida à análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), visando à obtenção de sua exoterma de degradação. As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, utilizando o calorímetro DSC Mettler-Toledo FP9 com detector DSC 50.

Amostras em pó de cada uma das ligninas com massas de aproximadamente 10,0 mg foram pesadas e colocadas em porta amostras de alumínio apropriadas para esta análise. As amostras foram aquecidas de 25 até 500°C a uma velocidade de 10°C/min sob uma razão de fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

10.3.2.4.Análise da Distribuição de Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As distribuições de massa molar das ligninas precipitadas foram realizadas através da técnica de cromatografia de permeação em gel. Esta técnica, também chamada de cromatografia de exclusão por tamanho ou por filtração em gel é uma técnica poderosa, aplicável particularmente a espécies de alto peso molecular.

O empacotamento da coluna consiste de partículas pequenas de sílica ou de polímeros, contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Enquanto estão nos poros, as moléculas estão efetivamente retidas e ausentes do fluxo da fase móvel. O tempo médio de residência nos poros depende do tamanho efetivo das moléculas do analito. Moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a serem eluídas.

Moléculas com diâmetros significativamente menores do que os poros podem penetrar ou permear através do emaranhado de poros e ficar retidas por tempos maiores, sendo assim as últimas a serem eluídas.

Desta forma, o tempo de retenção está inversamente relacionado ao volume hidrodinâmico, o qual para efeito de análise é considerado como sendo proporcional à massa molecular do analito.

Foi empregado para estas análises o cromatógrafo Shimadzu interligado a um analisador de dados CLASS-LC10. As análises foram realizadas pelo Grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química da USP - São Carlos. As seguintes condições de análise foram utilizadas:

- Colunas: Pré-coluna PLGel, seguida de PLGel 500, 103 e 104 Å (Polymer Laboratories);
- Temperatura: 35°C;
- Pressão: 721 kgf/cm²;
- Eluente: THF;
- Fluxo: 1,0 mL/min;
- Concentração da amostra: 4,0 mg/mL;
- Volume de injeção: 20µL;
- Detector: IR e UV (254 nm);
- Limite de exclusão da coluna: 100 – 700.000 (PS);
- Padrões: Poliestireno com massas molares de 770.000, 330.000, 195.000, 66.000, 28.000, 12.500, 7.000, 3.770, 1.700, 1.060, 580 g/mol, benzila (210 g/mol) em etilbenzeno (106 g/mol).

10.4.Resultados e Discussões

10.4.1.Produção do Biogás

10.4.1.1.Análise da DQO

Após reações para determinação da DQO nas amostras de licores de pré-tratamento e resíduos de hidrólise, os resultados foram apresentados na Tabela 10.3.

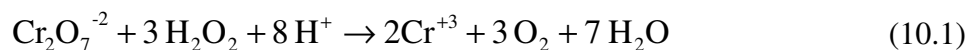
Tabela 10.3: Valores de DQO para cada uma das amostras estudadas.

Concentração de sólidos na etapa de pré- tratamento (% , m/v)	DQO (g O ₂ /L ou g O ₂ /g biomassa)	
	Hidróxido de cálcio	Peróxido de hidrogênio alcalino
4	10,04 ± 0,07	21,43 ± 0,35
5	12,61 ± 0,56	23,23 ± 0,04
6	11,60 ± 0,29	27,65 ± 0,41
7	16,82 ± 0,87	37,03 ± 2,41
8	21,15 ± 1,13	43,45 ± 2,38
9	-	45,15 ± 0,70
10	-	58,17 ± 3,03
15	-	67,38 ± 2,91
4*	1,06 ± 0,02	1,09 ± 0,03

*Resíduo de hidrólise enzimática, g O₂/g biomassa.

Analisando a Tabela 10.3 observa-se que os valores de DQO para os licores de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino são maiores do que para os licores de pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Esta relação está diretamente relacionada com a maior concentração de xilana e lignina presente neste licor após o pré-tratamento. Além disso, um possível excesso de peróxido de hidrogênio no meio reacional pode ocasionar um aumento no valor da DQO.

A concentração residual de peróxido de hidrogênio interfere na medida de DQO ao consumir o agente oxidante K₂Cr₂O₇, como mostra a Equação 10.1 (TALINLI e ANDERSON, 1992).



Esta interferência pode ser corrigida conhecendo-se a concentração residual de peróxido de hidrogênio em cada licor de pré-tratamento. Alguns análises utilizando métodos oxidativos (OLIVEIRA *et al.*, 2001, TEIXEIRA *et al.*, 2003) foram realizadas, mas não tiveram sucesso devido a interferência da lignina.

Segundo LIN e LO (1997), concentrações de 1,0 g/L de peróxido de hidrogênio são equivalente a 270 mg/L de DQO. Resultados similares foram obtidos por DANTAS (2005), 263 mg/L de DQO em 1,0 g/L de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, mesmo havendo uma presença do peróxido residual no licor de pré-tratamento, a interferência no valor final da DQO seria muito baixa em relação aos valores apresentados na Tabela 10.3.

No Brasil, a vinhaça, obtida após destilação do vinho delevedurado, apresenta uma faixa de DQO de 15 a 33 g O₂/L vinhaça, quando proveniente da fermentação com caldo, de 40 a 50 O₂/L vinhaça, quando a fermentação é realizada com caldo e mel e de 60 a 75 O₂/L vinhaça, quando a vinhaça é obtida da fermentação com melaço (LAMO, 1991).

10.4.1.2. Matéria Seca (MS) e Matéria Orgânica (MO)

As matérias seca e orgânica foram determinadas para os resíduos após hidrólise enzimática e para o lodo utilizado no processo de biodigestão. A Tabela 10.4 apresenta os valores obtidos para os resíduos sólidos da hidrólise. Para o lodo, foram encontrados valores de $91,3 \pm 0,002$ g de matéria seca/L de lodo e $76,6 \pm 0,001$ g de matéria volátil/L de lodo.

Estes valores são de suma importância para calcular a quantidade de resíduo sólido e lodo ativado a ser adicionada ao biodigestor sem que haja prejuízos para o bom andamento do processo.

Tabela 10.4: Valores de MS e MO nos resíduos de hidrólise.

Resíduo de hidrólise	MS (% , m/m)	MO (% , m/m)
Hidróxido de cálcio	$97,22 \pm 0,01$	$92,70 \pm 0,02$
Peróxido de hidrogênio	$91,64 \pm 0,02$	$82,37 \pm 0,01$

10.4.1.3. Análise dos Ácidos Graxos Voláteis e Açúcares

A Tabela 10.5 apresenta as concentrações dos ácidos graxos voláteis e açúcares encontrados nos licores de pré-tratamento.

Tabela 10.5: Concentrações dos ácidos graxos voláteis e açúcares quantificados nos licores de pré-tratamento.

Amostras	Ácido acético (g/L)	Ácido propiônico (g/L)	Ácido iso-butírico (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Ácido iso-valérico (g/L)	Ácido valérico (g/L)	Concentração de açúcares (g/L)
4% cal	0,161	0,000	0,422	0,322	*nd	11,511	1,504
5% cal	2,480	0,000	0,359	0,301	*nd	11,294	2,196
6% cal	0,624	0,000	0,335	0,304	*nd	11,441	1,787
7% cal	1,798	0,000	0,336	0,334	*nd	11,587	2,933
8% cal	1,282	0,000	0,394	0,300	*nd	12,049	2,904
4% peróxido	1,997	0,000	0,494	0,480	*nd	8,844	7,565
5% peróxido	2,403	0,000	0,561	0,534	*nd	8,899	8,625
6% peróxido	2,873	0,401	0,730	0,759	*nd	8,780	12,773
7% peróxido	2,901	0,332	0,895	0,893	*nd	9,109	16,598
8% peróxido	3,018	0,373	0,961	1,003	*nd	8,937	19,731
9% peróxido	3,314	0,540	0,964	0,955	*nd	8,822	16,920
10% peróxido	4,188	0,472	1,254	1,430	*nd	9,214	20,330
15% peróxido	5,226	0,494	1,663	1,885	*nd	9,110	21,759

*nd: não detectável

Observa-se analisando a Tabela 10.5 que maiores concentrações de açúcares são observadas nos licores de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. Este fato já foi anteriormente notado, uma vez que o pré-tratamento com peróxido proporciona uma melhor solubilização da hemicelulose, aumentando assim a concentração de açúcares no licor de pré-tratamento.

Em relação aos ácidos graxos voláteis, os ácidos valérico e acético foram os que apresentaram maiores concentrações, sendo que maiores concentrações são obtidas com o aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

10.4.1.4.Composição Química do Biodigestor

Utilizando os dados obtidos nas análises de DQO, MS e MO, foi determinada a quantidade de cada componente dentro do biodigestor. Para os cálculos foram utilizados como parâmetros de entrada uma concentração de lodo de 5 g de matéria volátil/L, concentração de amostra de 2,5 DQO/L e razão de DQO:Nitrogênio:Fósforo de 100:3:1.

Os cálculos foram realizados através de um programa computacional desenvolvido pelo INRA, Narbonne, baseando na quantidade de cada elemento necessário para o bom desenvolvimento do processo (Tabela 10.2) e segundo dados propostos por ZINDER *et al.* (1984).

A Tabela 10.6 apresenta a concentração dentro do biodigestor de cada uma das soluções preparadas, segundo a Tabela 10.2, e a concentração de cada um dos nutrientes inorgânicos calculados a partir das soluções nutrientes.

Tabela 10.6: Concentração das soluções nutrientes presentes no biodigestor.

Soluções	Concentração (mg/L)	Nutrientes inorgânicos	Concentração (mg/L)
NH ₄ Cl	286	N-NH ₄	75
KH ₂ PO ₄	108	P-PO ₄	25
MgCl ₂ , 6H ₂ O	65	Mg	7,7
CaCl ₂ , 2H ₂ O	32	Ca	8,8
Na ₂ S, 9H ₂ O	100	S	13,4
FeCl ₂ , 4H ₂ O	20	Fe	5,6
CoCl ₂ , 6H ₂ O	5	Co	1,24
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1	Mn	0,28
NiCl ₂ , 6H ₂ O	1	Ni	0,25
ZnCl ₂	0,5	Zn	0,24
H ₃ BO ₃	0,5	B	0,09
Na ₂ SeO ₃	0,5	Se	0,23
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,4	Cu	0,15
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,1	Mo	0,04

As Tabelas 10.7 e 10.8 apresentam a composição dos biodigestores anaeróbios com licores de pré-tratamento e resíduos de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

Tabela 10.7: Quantidade de cada componente adicionado ao biodigestor para análise dos resíduos de processo do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Composição do biodigestor (mL)	4%	5%	6%	7%	8%	Resíduo de hidrólise
Licor de pré-tratamento	17,4	13,9	15,1	10,4	8,27	0,19*
Solução mãe macro	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Solução de oligoelementos	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampão bicabornato	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Inóculo	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
Solução Na ₂ S.9H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Água destilada	43	46	45	50	52	60

*quantidade em g

Tabela 10.8: Quantidade de cada componente adicionado ao biodigestor para análise dos resíduos de processo do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Composição do biodigestor (mL)	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	15%	Resíduo de hidrólise
Licor de pré-tratamento	8,2	7,5	6,3	4,7	4,0	3,9	3,0	2,6	0,21*
Solução mãe macroelementos	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Solução de oligoelementos	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampão bicabornato	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Inóculo	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
Solução Na ₂ S.9H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Água destilada	52,2	52,8	54,0	55,6	56,3	56,5	57,3	57,7	60,1

*quantidade em g

10.4.1.5. Análise do Volume de Biogás Produzido

A Figura 10.1 apresenta a composição química dos resíduos de hidrólise enzimática para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O termo MS está relacionado com a matéria solúvel presente neste resíduo.

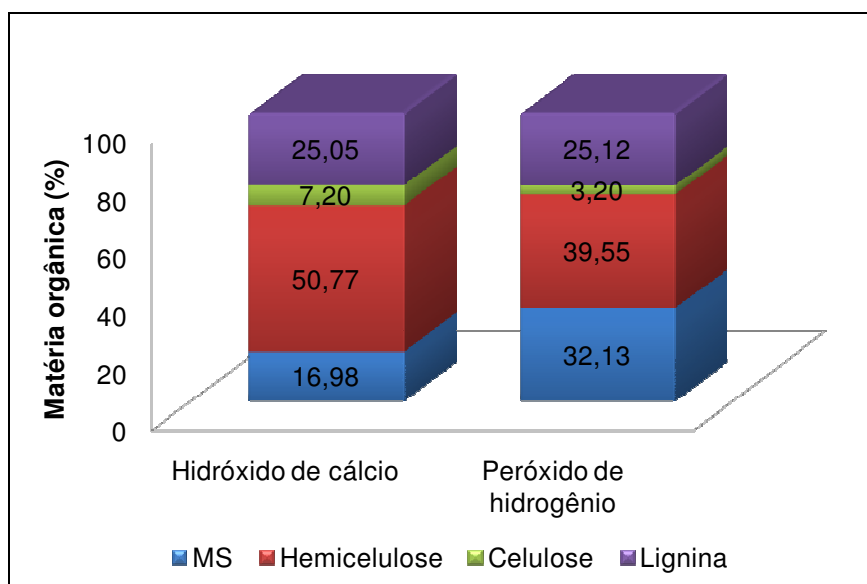


Figura 10.1: Composição química do resíduo de hidrólise enzimática.

Analizando a Figura 10.1 é possível observar que o resíduo de hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio apresenta-se constituído de maior fração de hemicelulósica do que o resíduo do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Observa-se ainda uma baixa presença de celulose nos resíduos e quantidades equivalentes de lignina no material.

As Figuras 10.2 e 10.3 mostram a composição do biogás ao final do processo de biodigestão para os resíduos do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente. É apresentada ainda a composição do biogás produzido pelo lodo (branco).

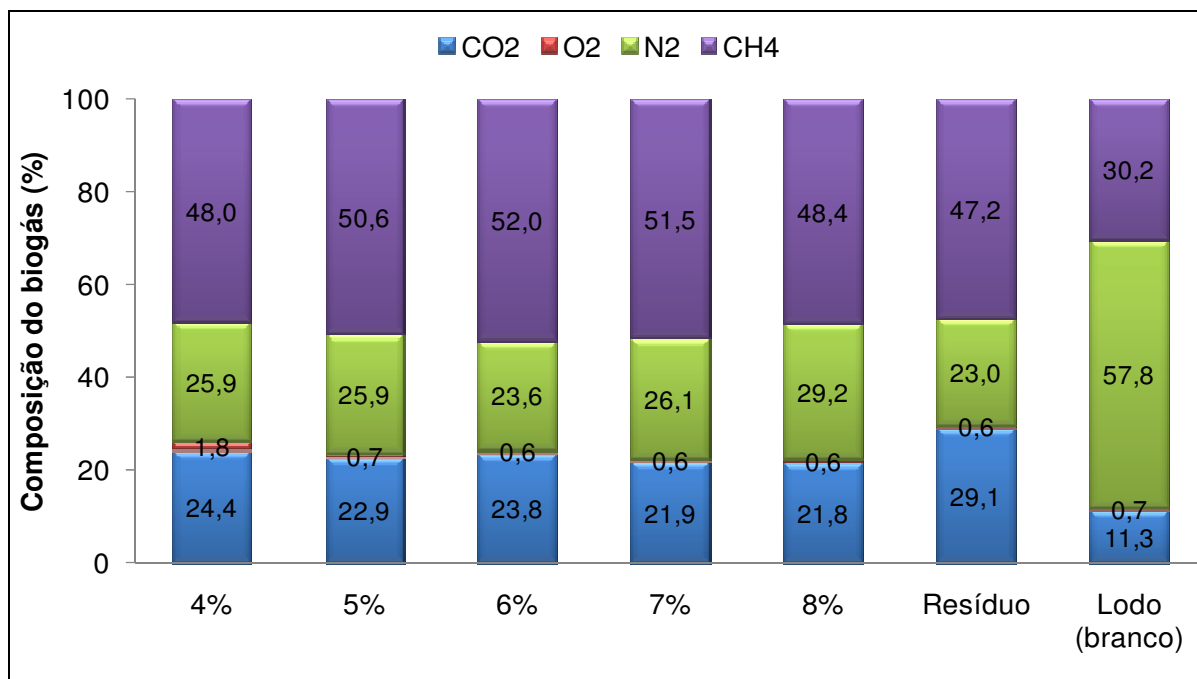


Figura 10.2: Composição do biogás obtido após biodigestão dos resíduos de pré-tratamento e hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

Nota-se ao analisarmos as Figuras 10.2 e 10.3 que há uma grande presença do gás nitrogênio em todos os ensaios. Isto se deve ao fato de que este gás foi inserido no reator para tornar o sistema anaeróbio, não sendo produzido pelas bactérias. Observa-se ainda que os resíduos do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio apresentam-se, na maioria dos casos, com uma composição maior de metano do que os resíduos de peróxido de hidrogênio.

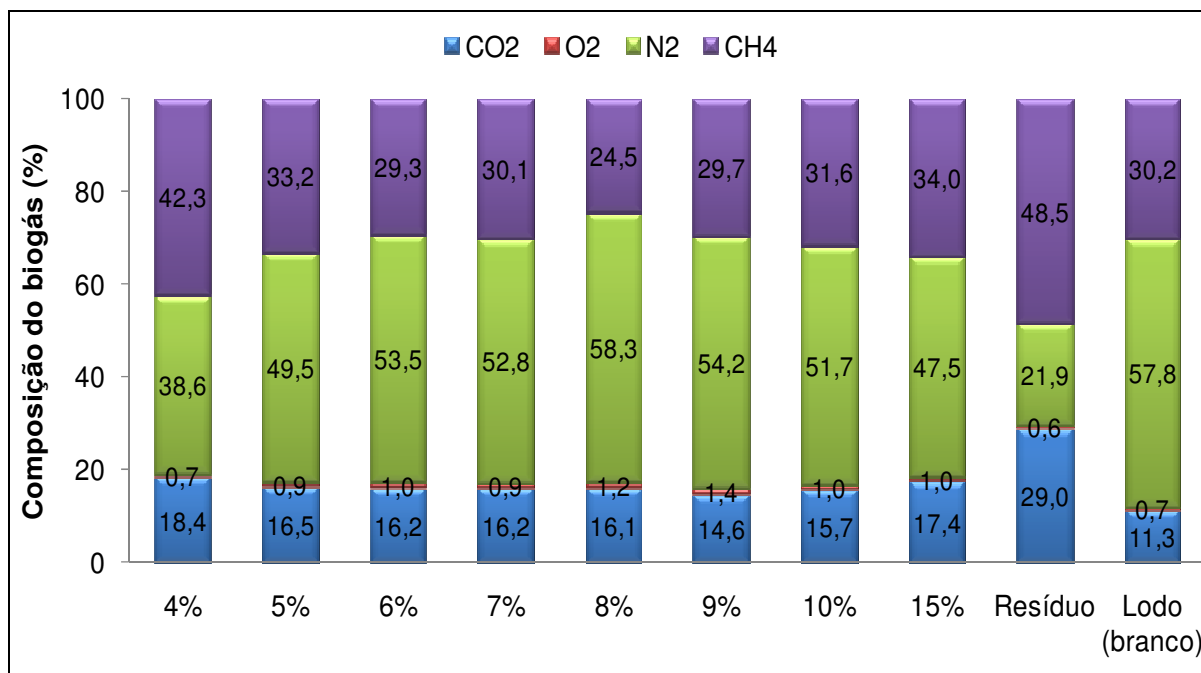


Figura 10.3: Composição do biogás obtido após biodigestão dos resíduos de pré-tratamento e hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Um dos critérios utilizados na operação e controle de um reator para a produção de biogás é a estimativa da produção potencial de biogás a partir de um resíduo. Segundo SOUZA (1986), essa estimativa é feita a partir dos seguintes fatores:

- A produção teórica de CH_4 , em um estado constante, é proporcional a quantidade de DQO (Demanda Química de Oxigênio) consumida no reator (1 g de DQO consumido corresponde à produção de $0,35 \text{ Ndm}^3 \text{ CH}_4$; a temperatura e pressão normais);
- Uma parte do biogás produzido é dissolvida e perdida no efluente;
- Parte da DQO é transformada em biomassa.

Sendo assim, assume-se a produção teórica de metano como sendo de $350 \text{ Ncm}^3/\text{g}$ de DQO, considerando a biodegradabilidade da matéria orgânica, a eficiência do conversor de biogás e a fração de matéria orgânica utilizada pelas bactérias para seu próprio crescimento como os principais fatores que afetam este rendimento.

As Figuras 10.4 e 10.5 mostram o volume do gás metano produzido em relação à demanda química de oxigênio para os ensaios com os resíduos de processo utilizando o hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente. Além disso, os resultados foram comparados com a produção de biogás sem adição da amostra (branco do lodo).

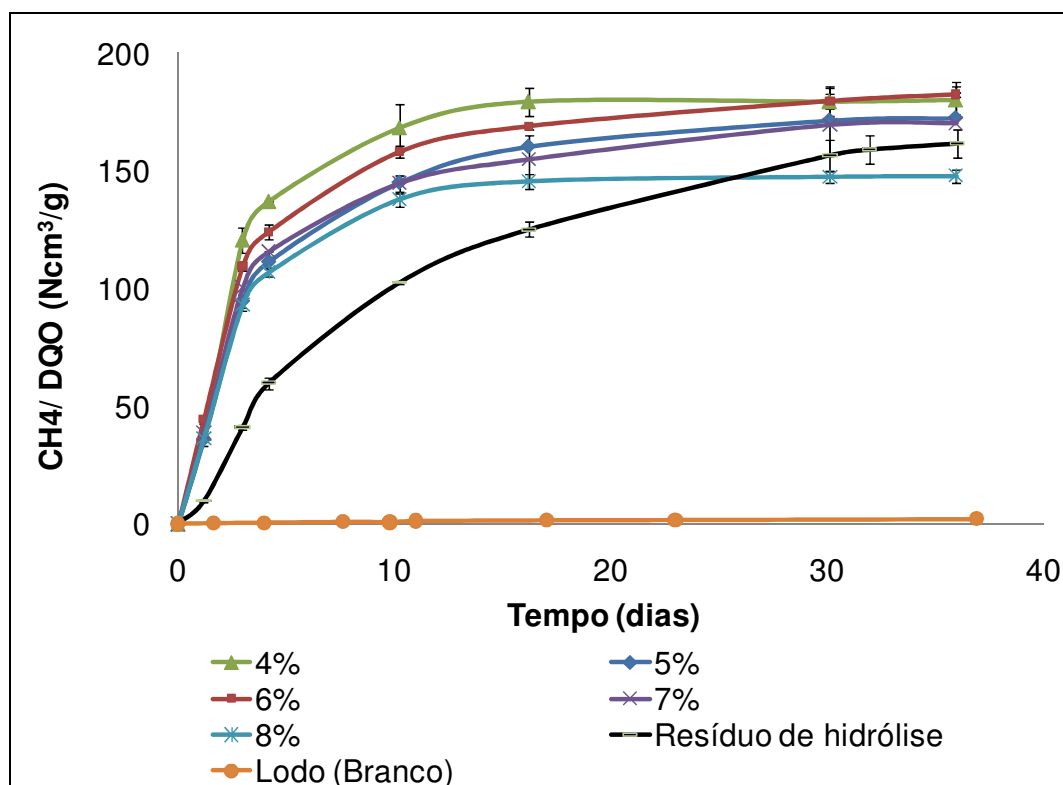


Figura 10.4: Volume de metano produzido em relação à DQO para os resíduos do processo de produção de etanol a partir do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

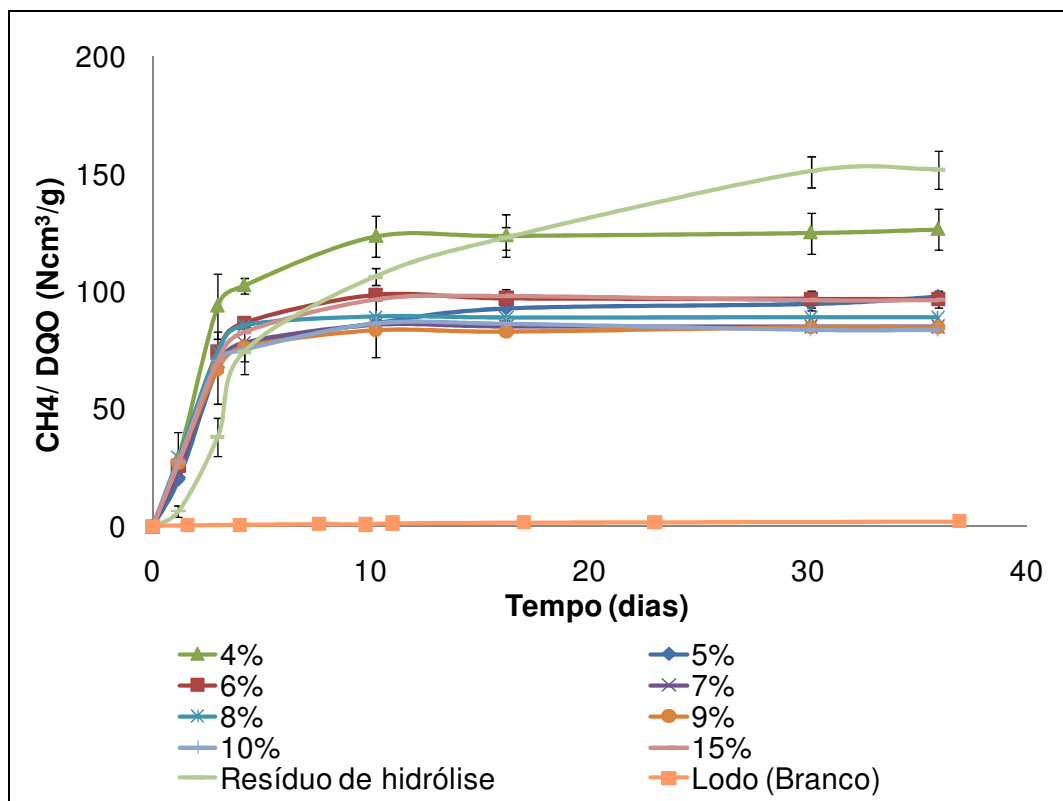


Figura 10.5: Volume de metano produzido em relação à DQO para os resíduos do processo de produção de etanol a partir do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Analisando as Figuras 10.4 e 10.5 observaram-se maiores volumes de metano produzido em relação à DQO para os resíduos do processo do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Para os dois pré-tratamentos, observa-se que quanto maior a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, menor é o volume de metano produzido em relação à DQO.

Assim, para o licor de pré-tratamento, a maior produção de metano se deu trabalhando com 4% (m/v) de sólidos para os dois pré-tratamentos, sendo produzidos $180,09 \pm 6,08$ Ncm³ de metano/g DQO para o licor do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e $126,58 \pm 8,78$ Ncm³ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento do peróxido de hidrogênio alcalino.

Observa-se, ainda, analisando as Figuras 10.4 e 10.5 que, para os resíduos sólidos, obtidos após hidrólise enzimática, foi produzido $171,51 \pm 8,72$ Ncm³ de metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio contra $165,62 \pm 6,14$ Ncm³ de

metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Segundo LAMO (1991), é possível obter através da biodigestão da vinhaça, 300 Ncm³ de CH₄/g DQO consumida, com uma proporção de metano no biogás de 55 a 65%.

A Figura 10.6 apresenta a relação entre o volume de metano produzido e o volume de licor de pré-tratamento utilizado. Observa-se que quanto maior a concentração de sólidos durante a etapa de pré-tratamento, maior é a produção de metano, já que com o aumento da concentração de sólidos há também um aumento da concentração de açúcares e de ácidos graxos voláteis no meio reacional, aumentando assim o rendimento do processo.

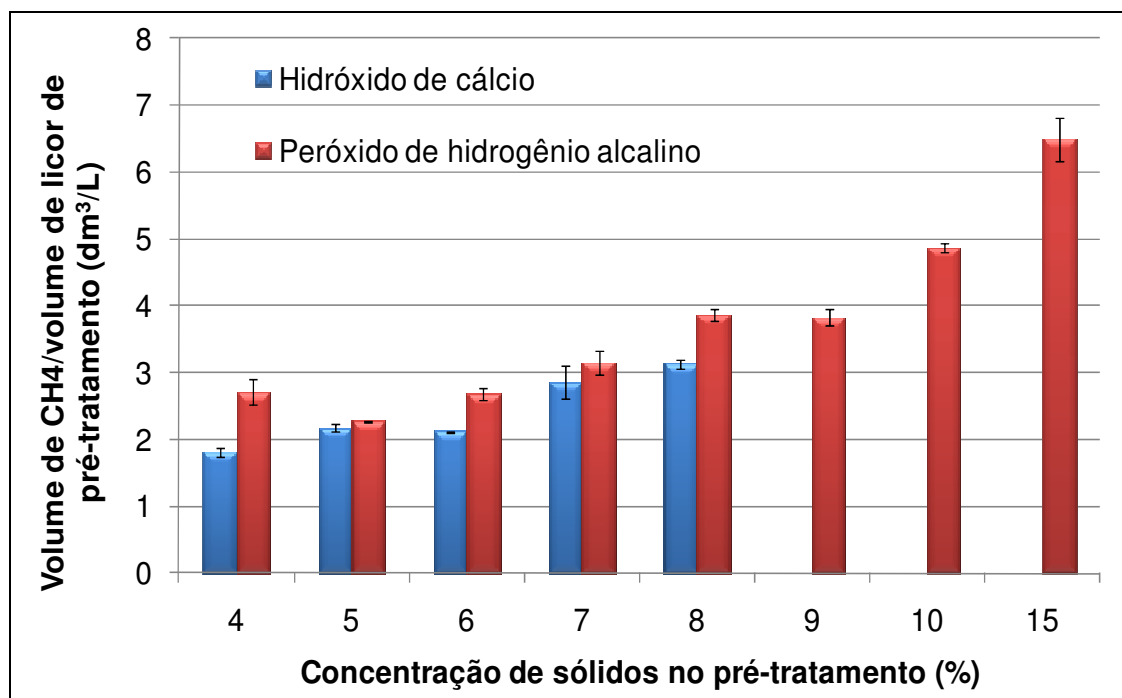


Figura 10.6: Volume de metano produzido em relação ao volume de licor de pré-tratamento.

Em relação ao resíduo de hidrólise enzimática, a Figura 10.7 mostra resultados bem similares para os dois pré-tratamentos, sendo possível produzir $167,16 \pm 6,14$ Ndm³ de metano/kg do resíduo de hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e $165,62 \pm 8,72$

Ndm³ de metano/kg do resíduo de hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

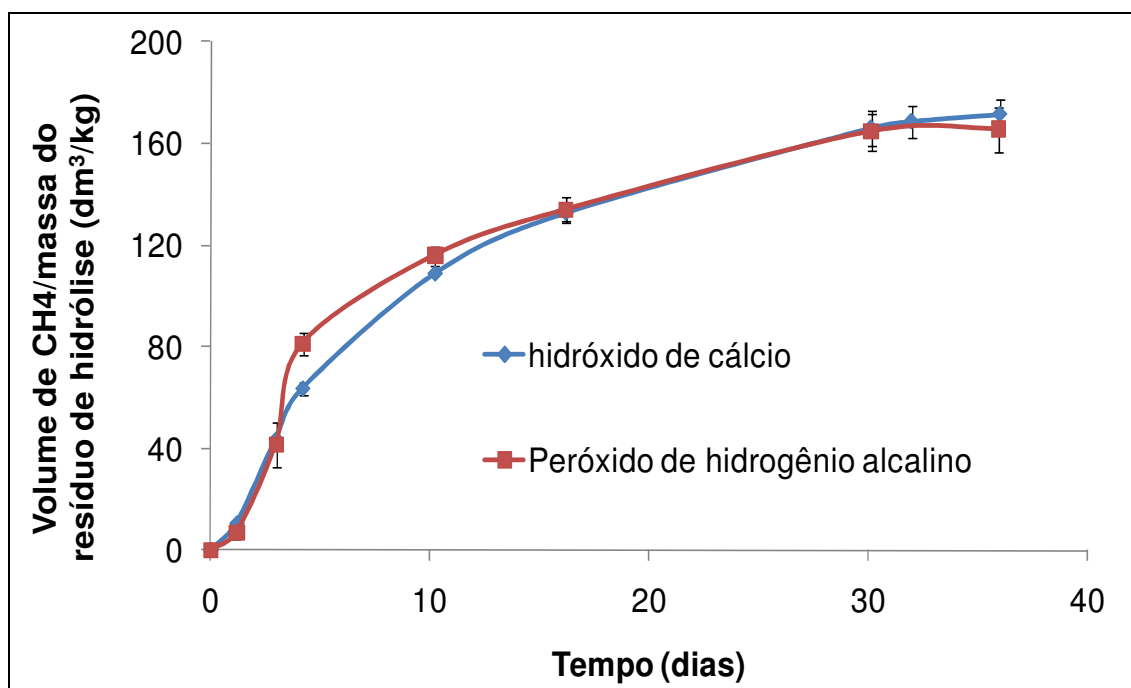


Figura 10.7: Volume de metano produzido em relação à massa de resíduo da hidrólise enzimática.

10.4.2. Análises para o Aproveitamento da Lignina

10.4.2.1. Teor de Umidade e Análise Térmica da Lignina

O poder calorífico de um material está diretamente relacionado com o teor de umidade. Após análises, segundo metodologia descrita no *apêndice I*, a Tabela 10.9 apresenta a massa de lignina precipitada e o teor de umidade para cada um dos pré-tratamentos.

Tabela 10.9: Quantidade de lignina recuperada e teor de umidade.

Lignina	Quantidade recuperada (g/kg de bagaço)	Teor de umidade (%)
Hidróxido de cálcio	$139,63 \pm 0,0134$	$22,72 \pm 0,472$
Peróxido de hidrogênio alcalino	$147,28 \pm 0,0158$	$19,43 \pm 0,123$

A Figura 10.8 apresenta as curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) das ligninas precipitadas do licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. Observa-se que a exoterma de degradação da lignina obtida do pré-tratamento do peróxido de hidrogênio alcalino ocorre a uma menor temperatura que para a lignina obtida do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

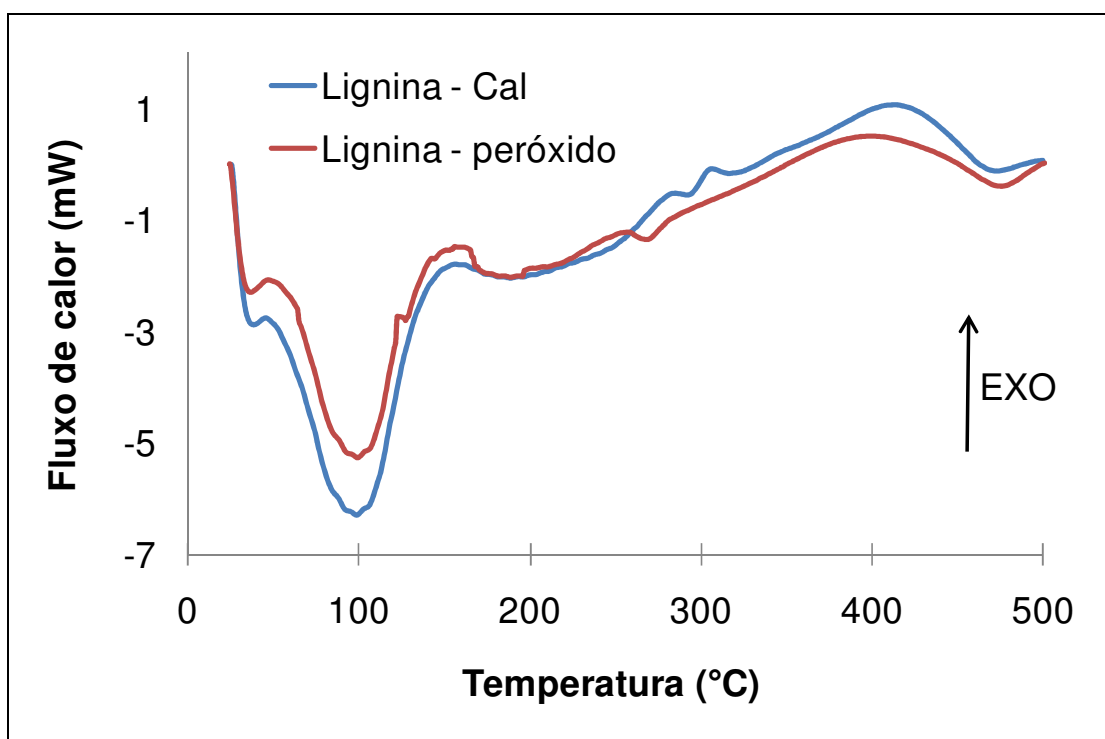


Figura 10.8: Curvas de DSC das ligninas.

Uma possível explicação para este comportamento é que para o processo com peróxido de hidrogênio alcalino a lignina sofre uma forte oxidação, o que acaba provocando uma decomposição do seu esqueleto. Isso acaba gerando outros possíveis sítios de decomposição térmica, levando a lignina a se decompor a uma menor temperatura, comparada com a lignina de hidróxido de cálcio.

É possível verificar ainda, analisando a Figura 10.8, o teor de umidade do material através da curva endotérmica à temperatura de 100°C. Nota-se realmente que o teor de umidade da lignina obtida do licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresentou um teor de umidade maior do que para a lignina isolada do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, como apresentado na Tabela 10.9.

Utilizando Calorimetria Diferencial de Varredura podemos verificar que a temperatura de degradação da lignina isolada do pré-tratamento com hidróxido de cálcio é de 413,5° C, apresentando uma entalpia de 67,9 J/g. Em contrapartida, a lignina isolada do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou uma temperatura de 400,6° C, com entalpia de 52,5 J/g.

Estudos realizados por SOUZA (2006), utilizando a lignina da DEDINI obtida pelo processo organosolv, mostra que a lignina isolada deste processo apresenta temperatura de degradação de 395°C, com entalpia de 106 J/g.

10.4.2.2. Análise das Ligninas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Após análise por GPC, através da curva padrão de distribuição de massas molares, foi possível calcular a massa molecular média em massa ($\overline{M}_w$) e em número ($\overline{M}_n$), para as ligninas obtidas após precipitação no licor de pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio alcalino.

A polidispersividade foi calculada utilizando a seguinte relação:

$$\text{Polidispersividade} = \overline{M_w} / \overline{M_n} \quad 10.2$$

Onde: $\overline{M_w}$ é a massa molecular média em massa que se refere a uma média ponderada onde cada molécula contribui para a $\overline{M_w}$ na proporção do quadrado da sua massa; e $\overline{M_n}$ é a massa molecular média em número que se refere à massa total de todas as moléculas (1 mol) em relação ao número total de mols de moléculas presentes.

A Tabela 10.10 apresenta os valores de massa molecular média em massa e em número, e o valor da polidispersividade das ligninas precipitadas. Nos dois casos, as ligninas apresentaram uma baixa solubilidade no eluente THF, sendo assim os resultados apresentados são representativos apenas para a fração solúvel.

Tabela 10.10: Valores de $\overline{M_w}$, $\overline{M_n}$ e polidispersividade para as ligninas obtidas após precipitação no licor de pré-tratamento do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Lignina	$\overline{M_w}$	$\overline{M_n}$	$\overline{M_w} / \overline{M_n}$
Hidróxido de cálcio	907	460	3,66
Peróxido de hidrogênio alcalino	952	502	3,88

Analisando a Tabela 10.10 nota-se que a lignina isolada do processo com peróxido de hidrogênio alcalino apresenta fragmentos com massas molares média em massa ($\overline{M_w}$) superiores aos da lignina precipitada do licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Além disso, a lignina de peróxido produz um maior número de fragmentos de ligninas com massas molares diferentes, que é evidenciado pelo maior grau de polidispersividade desta lignina.

A princípio poderíamos esperar que maiores intensidades de condensação (da própria lignina e da lignina com os carboidratos) deveriam levar a um aumento da massa molar. Contudo,

as análises são significativas apenas para a parte solúvel das ligninas, sendo assim, não foi possível quantificar (pela análise da massa molar) a extensão das reações de condensação.

10.5. Conclusões

Neste capítulo foi estudada uma proposta inicial para a utilização dos resíduos da etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Foi proposta uma separação do licor de pré-tratamento visando a obtenção, na fração solúvel, de um licor rico em açúcares não fermentescíveis e na fração insolúvel, da lignina precipitável. Para o resíduo obtido após etapa de hidrólise enzimática e para a fração líquida do licor de pré-tratamento, a proposta é a produção de biogás. A lignina foi testada quando ao seu poder de recuperação e entalpia. O objetivo, nos dois casos, é utilizar o biogás produzido e a lignina precipitável na queima direta em caldeias para geração de energia para o processo produtivo.

Os resultados mostram altos valores de DQO para os licores de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, estando este fato diretamente relacionado com a maior quantidade de xilana e lignina solubilizada.

Os maiores volumes de biogás produzido em relação à DQO foram observados para os resíduos do processo do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Para os dois pré-tratamentos, observou-se que quanto maior a concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento, menor é o volume de biogás produzido em relação à DQO do resíduo.

Foram produzidos $180,09 \pm 6,08 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento do hidróxido de cálcio com 4% (m/v) de sólidos contra $126,58 \pm 8,78 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento do peróxido de hidrogênio com 4% (m/v) de sólidos.

Para os resíduos sólidos, obtidos após hidrólise enzimática, foi possível produzir $171,51 \pm 8,72 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio contra $165,62 \pm 6,14 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Em relação ao volume de metano produzido pelo volume de licor de pré-tratamento utilizado, observou-se que quanto maior a concentração de sólidos durante a etapa de pré-tratamento, maior é a produção de metano, já que com o aumento da concentração de sólidos há também um aumento da concentração de açúcares no meio reacional e de ácidos graxos voláteis, aumentando assim o rendimento do processo.

Em relação ao resíduo de hidrólise enzimática, observaram-se resultados bem similares, para os dois pré-tratamentos, em relação à produção de biogás. Foi possível produzir $167,16 \pm 6,14 \text{ Ndm}^3$ de metano/kg do resíduo de hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e $165,62 \pm 8,72 \text{ Ndm}^3$ de metano/kg do resíduo de hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Em relação à lignina, foi possível recuperar $139,63 \pm 0,0134 \text{ g/kg}$ de bagaço no licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio contra $147,28 \pm 0,0158 \text{ g/kg}$ de bagaço no licor de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, apresentando um teor de umidade de aproximadamente 22,72% e 19,43%, respectivamente, após secagem a temperatura ambiente.

Analisando a entalpia da lignina, foi possível verificar que a exoterma de degradação da lignina precipitada no licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresentou uma temperatura de 413,5°C, com uma entalpia de 67,9 J/g. Já a lignina isolada do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou uma temperatura de 400,6°C, com entalpia de 52,5 J/g.

CAPÍTULO 11

CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho o desempenho dos pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino foi avaliado com o objetivo de estudar a produção de etanol de segunda geração a partir da fermentação dos hidrolisados enzimáticos obtidos nas condições ótimas dos processos.

No capítulo 2 foi apresentada uma revisão bibliográfica descrevendo todas as etapas envolvidas no processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, além de estudos relacionados ao aproveitamento dos resíduos.

No capítulo 3 foi apresentada toda a metodologia empregada na separação e caracterização química do material lignocelulósico, e das enzimas celulase e β -glicosidase, além dos resultados relacionados a esta preparação, como análise compositiva de cada biomassa estudada, análise das atividades enzimáticas e de seus efeitos sob o pH e a temperatura do meio.

Nesta etapa foi possível observar, através da análise granulométrica, que aproximadamente 85,59% do bagaço “in-natura” apresentou um diâmetro médio superior a 1,689 mm. Dentre esta proporção observou-se uma grande heterogeneidade de tamanhos de fibra. Em se tratando da composição química dos dois materiais estudados, foi observado que o bagaço não peneirado apresentou em sua constituição uma maior quantidade de fibras, ao contrário do bagaço peneirado, cuja composição química assemelha-se mais com a parte medular da planta.

No capítulo 4 foi realizado um estudo inicial das condições de pré-tratamento visando à comparação de dois tamanhos de partícula: o bagaço de cana não peneirado e peneirado. Foram

utilizados como agentes de pré-tratamento o hidróxido de cálcio (cal) e peróxido de hidrogênio alcalino, levando em consideração os efeitos da variável tempo reacional, temperatura e concentração do reagente em relação a sua eficiência em liberar os açúcares após hidrólise enzimática. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, as condições já haviam sido otimizados em trabalhos anteriores. Os resultados foram analisados mediante um planejamento estatístico linear através de software estatístico comercial.

Para os dois pré-tratamentos não foi observada a necessidade de se diminuir o tamanho da partícula para melhorar a acessibilidade da enzima durante a etapa de hidrólise. Este resultado não se trata de um caso generalizado, uma vez que a fração principal do material denominado como bagaço peneirado era composto por medula. Assim, a etapa de redução do tamanho da partícula não deve ser descartada em novos estudos. Além disso, a diminuição do tamanho da partícula acaba gerando algumas vantagens em se tratando da fluidodinâmica em reatores e na questão de cinética das reações.

O pré-tratamento com hidróxido de cálcio proporcionou rendimentos de glicose similares para o bagaço não peneirado e peneirado, de 0,202 g/g biomassa bruta seca e 0,211 g/g biomassa bruta seca, respectivamente. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o bagaço não peneirado levou a resultados melhores em termos de quantidade de glicose liberada após hidrólise se comparado com o bagaço peneirado, 0,309 g/g biomassa bruta seca e 0,239 g/g biomassa bruta seca, respectivamente.

Em relação às análises estatísticas, para os dois pré-tratamentos foi possível propor modelos lineares estatisticamente significativos a 90% de confiança para descrever as concentrações de glicose liberadas em função dos fatores considerados.

No capítulo 5 foi apresentada a escolha do bagaço a ser utilizado na etapa de otimização, sendo descritas todas as análises e resultados do planejamento estatístico composto central visando à otimização dos pré-tratamentos.

O bagaço não peneirado foi selecionado para utilização na etapa de otimização do pré-tratamento, já que este proporcionou um maior aproveitamento da matéria prima como um todo, além de levar à rendimentos maiores ou similares de glicose em relação ao bagaço peneirado.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino mostrou-se superior ao pré-tratamento com hidróxido de cálcio uma vez que, tanto a produtividade quanto o rendimento em glicose foram significativamente superiores.

Os resultados da concentração dos açúcares liberados após hidrólise enzimática a 50°C, pH 4,8 e carga enzimática de 3,5 FPU/g biomassa seca pré-tratada e 1,0 CBU/g biomassa seca pré-tratada, foram de 0,233 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,188 g/g biomassa bruta seca de xilose, para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio (90 h, 90,0°C e 0,47 g/g de cal) e 0,380 g/g biomassa bruta seca de glicose e 0,158 g/g biomassa bruta seca de xilose para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (1 h, 25°C, 7,36% (v/v) H₂O₂ em pH 11,5). Os rendimentos de glicose correspondentes foram de 51,8% e 83,4% para os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente.

No capítulo 6 foi apresentado um estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento do bagaço com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O intuito desta etapa é visualizar a carga máxima de sólidos possível para entrada no reator de pré-tratamento sem que haja um comprometimento no desenvolvimento da etapa de hidrólise enzimática e consequentemente no rendimento dos açúcares fermentescíveis.

Foi possível observar que com o aumento da concentração de sólidos, para os dois pré-tratamentos, houve uma diminuição da eficiência do processo de pré-tratamento em relação à deslignificação e solubilização da hemicelulose. Em todos os ensaios não foram observadas perdas significativas de celulose.

Em relação à concentração de sólidos, foi possível trabalhar com até 8% (m/v) de bagaço no pré-tratamento com hidróxido de cálcio e com até 15% (m/v) no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, sem que isso prejudicasse na homogeneização do material.

O melhor rendimento global de glicose foi obtido a uma concentração de 4% (m/v) de sólidos para os dois pré-tratamentos, sendo de 53,6% para o bagaço pré-tratado com cal e 83,9% para o peróxido, utilizando uma carga enzimática de 3,5 FPU/g bagaço seco pré-tratado e 1,0 CBU/g bagaço seco pré-tratado. Assim, foi estabelecido o pré-tratamento com 4% (m/v) de

sólidos como o ótimo para o processo. Do ponto de vista fluidodinâmico, os reatores suportam concentrações maiores de sólidos do que as estudadas nos dois pré-tratamentos.

Em relação à análise para determinação do índice de cristalinidade corrigido foi observado que este aumenta com o aumento da concentração de sólidos no reator, ou seja, é fortemente influenciado pela composição da biomassa.

No capítulo 7 foi apresentado um estudo da otimização da carga enzimática para a hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino nas condições previamente otimizadas. O intuito desta etapa foi determinar a carga enzimática mínima capaz de levar a um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. O efeito da carga enzimática no rendimento de açúcares fermentescíveis foi estudado através de análises utilizando o planejamento composto central (superfície de resposta) para determinar a quantidade ótima de celulase e β -glicosidase em cada um dos pré-tratamentos desenvolvidos.

Foi observado, na condição otimizada, que o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio requer bem menos enzima celulase do que o pré-tratamento com hidróxido de cálcio: 3,5 FPU/g de bagaço seco pré-tratado contra 50,0 FPU/g de bagaço seco pré-tratado, respectivamente. Este fato está diretamente relacionado à maior eficiência na deslignificação do material pré-tratado com peróxido.

Além disso, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou vantagens significativas, já que minimiza a concentração enzimática total (celulase + β -glicosidase). A relação celulase/ β -glicosidase apresenta-se de 0,14 para o bagaço pré-tratado com peróxido e 2 para o pré-tratado com hidróxido de cálcio, ou seja, 14,3 vezes menor para o material pré-tratado com peróxido.

Para o pré-tratamento de hidróxido de cálcio, foi observado no processo otimizado uma relação β -glicosidase/celulase muito baixa. Uma possibilidade de aumentar a eficiência da etapa de hidrólise enzimática seria aumentar esta relação.

No capítulo 8 foi apresentado um estudo do aumento da concentração de sólidos na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino. O intuito desta etapa é aumentar a concentração final de açúcares,

proporcionando assim uma maior eficiência energética, melhor produtividade cinética e maior conversão possível.

Foi observado que com o aumento da concentração de sólidos durante a etapa de hidrólise enzimática há um aumento da concentração de açúcares liberados no meio reacional, mas, em contrapartida, observa-se uma diminuição da eficiência do processo.

O processo em batelada alimentada foi visto como uma reposta para aumentar a concentração final de açúcares no meio, proporcionando, além disso, um melhor aproveitamento do reator.

Foi observado que com o aumento da concentração de sólidos no reator, para ambos os materiais pré-tratados, houve um acúmulo de celobiose ao longo do tempo. Neste caso, para melhores concentrações de açúcares serem obtidos seria necessário aumentar a concentração da enzima β -glicosidase

Em relação à produtividade, os resultados mostraram-se vantajosos quando se trabalhou com altas concentrações de sólidos. Os dois materiais pré-tratados apresentaram produtividade em uma mesma ordem, sendo um fator diferencial a carga da enzima celulase, 14,3 vezes maior para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio. Assim, considerando o fator enzima, o material pré-tratado com peróxido apresenta-se muito mais produtivo.

No capítulo 9 foram apresentados os resultados das fermentações dos hidrolisados visando à produção de etanol de segunda geração. Fermentações foram realizadas com os hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática, nas condições otimizadas, do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino, também nas condições otimizadas. Efetuaram-se estudos em modo batelada e contínuo, visando à avaliação da influência dos inibidores nesta etapa. No processo contínuo, optou-se por adicionar o hidrolisado, em diferentes concentrações, ao melaço industrial, objetivando assim uma integração do processo fermentativo convencional com o processo de etanol de segunda geração.

Os resultados mostraram que para o processo de fermentação contínua, a levedura foi capaz de manter um nível relativamente constante de atividade de fermentação durante todo curso

do processo. O mosto preparado com o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio promoveu a floculação da levedura devido ao fato da presença de íons cálcio.

Nos processos de fermentação contínua seria importante empregar um sistema para reativação ácida da levedura em pé-de-cuba, visando analisar a viabilidade da levedura após este reciclo.

Em relação ao processo em batelada, os resultados mostram que foi possível fermentar os hidrolisados puros sem que houvesse perdas de fermentabilidade por parte da levedura. Rendimentos finais de 89,2% foram encontrados para a fermentação do meio sintético de glicose, de 87,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e de 88,4% para o hidrolisado do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

No caso da fermentação em batelada, o estudo realizado no shaker pode levar a uma aeração superficial, o que acaba não reproduzindo fielmente as condições de fermentação. Além disso, não foi efetuada uma lavagem da levedura para eliminação dos nutrientes, o que pode favorecer ainda mais a fermentação. De toda forma, a presença de inibidores foi muito baixa, o que eventualmente não acarretaria problemas durante esta etapa. Além dos inibidores quantificados, furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético, seria interessante a quantificação dos inibidores fenólicos uma vez que estes apresentam grande fator inibitório.

Por fim, o capítulo 10 apresentou uma proposta para a utilização dos resíduos da etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Foi proposta uma separação do licor de pré-tratamento visando a obtenção, na fração solúvel, de um licor rico em açúcares não fermentescíveis e na fração insolúvel, a lignina precipitável. Para o resíduo obtido após etapa de hidrólise enzimática e para a fração líquida do licor de pré-tratamento, a proposta foi a produção de biogás. A lignina foi testada quanto à sua recuperação e entalpia. O objetivo, nos dois casos, foi utilizar o biogás produzido e a lignina precipitável na queima direta em caldeias para geração de energia para o processo produtivo.

Foram produzidos $180,09 \pm 6,08 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento do hidróxido de cálcio com 4% (m/v) de sólidos contra $126,58 \pm 8,78 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o licor de pré-tratamento do peróxido de hidrogênio com 4% (m/v) de sólidos.

Para os resíduos sólidos, obtidos após hidrólise enzimática, foi possível produzir $171,51 \pm 8,72 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio contra $165,62 \pm 6,14 \text{ Ncm}^3$ de metano/g DQO para o resíduo da hidrólise do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Sugere-se a utilização do resíduo de hidrólise como combustível primário e não a sua utilização na biodigestão devido, principalmente, ao tempo necessário para produção do biogás. O resíduo de hidrólise é composto basicamente por hemicelulose e lignina, ricos em carbono, podendo gerar bastante energia através da sua queima direta em caldeira. Uma análise interessante seria o cálculo do PCI (Poder Calorífico Inferior) das amostras através de formulas básicas (composição elementar C, H, N, O, S).

Em relação à lignina, foi possível recuperar $139,63 \pm 0,0134 \text{ g/kg}$ de bagaço no licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio contra $147,28 \pm 0,0158 \text{ g/kg}$ de bagaço no licor de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, apresentando um teor de umidade de aproximadamente 22,72% e 19,43%, respectivamente, após secagem a temperatura ambiente.

Analisando a entalpia da lignina, foi possível verificar que a exoterma de degradação da lignina precipitada no licor de pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresentou uma temperatura de $413,5^\circ\text{C}$, com uma entalpia de $67,9 \text{ J/g}$. Já a lignina isolada do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou uma temperatura de $400,6^\circ\text{C}$, com entalpia de $52,5 \text{ J/g}$.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se o desenvolvimento e aprofundamento do aprendizado desenvolvido nesta Tese de Doutorado, como explicitado a seguir:

- Caracterização estrutural do bagaço após etapa de pré-tratamento em relação a propriedades como porosidade, grau de polimerização, área superficial, dentre outros;
- Estudo cinético da etapa de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para cálculo de reator otimizado (máxima concentração de sólidos e condições ótimas de pré-tratamento);
- Determinação da variação do índice de cristalinidade da biomassa ao longo do processo da hidrólise enzimática visando encontrar uma relação entre o índice de cristalinidade e a digestibilidade da biomassa durante a etapa de hidrólise;
- Análise técnico-econômica dos pré-tratamentos propostos, podendo assim efetuar uma comparação com outros pré-tratamentos;
- Quantificação do excesso de peróxido de hidrogênio no licor de pré-tratamento através de métodos não colorimétricos, já que a lignina presente no meio interfere na utilização destes;
- Determinação da adsorção enzimática ao longo do processo de hidrólise, podendo ser efetuados através de isothermas de Langmuir;
- Modelagem cinética da hidrólise enzimática usando modelos determinísticos e/ou redes neurais;
- Estudos relacionados ao consumo de água no processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática;
- Modelagem cinética da etapa de fermentação usando como substrato melaço e hidrolisado a

diferentes porcentagens;

- Reprodução experimental dos processos de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação em escala semi-industrial;
- Caracterização da lignina precipitada através de espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C e determinação de grupos funcionais e fórmulas mínimas;
- Propostas de outras formas de aproveitamento dos resíduos do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, E. *Lignin chemistry-Past, Present and Future*. Wood Science Technology, 11, 169-218. 1977.
- ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulase activities. *Chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure*. National Renewable Energy Laboratory (NREL), LAP-006, 1996.
- AMJED, M., JUNG, H. G., DONKER, J. D. Effect of Alkaline Hydrogen Peroxide Treatment on Cell Wall Composition and Digestion Kinetics of Sugarcane Residues and Wheat Straw. *J. Anim. Sci.*, 70:2877-2884, 1992.
- ANDERSEN, NATALIJA. *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose - Experimental and Modeling Studies*. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007. Tese de doutorado.
- ANDRADE, RAFAEL RAMOS. *Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).
- ASTM E1721. Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass. American Society for Testing and Materials, U.S.A, 1-3, 1995.
- ASTM E1758. Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. American Society for Testing and Materials, U.S.A, 1-5, 1996.

- AZUMA, J., ASAI, T., ISAKA, M., *et al.* Effects of microwave irradiation on enzymatic susceptibility of crystalline cellulose. *J. Ferment. Technol.*, 63:529-536, 1985.
- AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health B*, 24(4):421-433, 1989.
- BALLERINI, A., EWERT, R., SOLÍS, M. Utilización de Ligninas en la formulación de adhesivos para tableros contrachapados. *Maderas: Ciencia y Tecnología*, 2000.
- BARR, B. K., HSIEH, Y-L, GANEM, B., WILSON, D. B. Identification of two functionally distinct classes of exocellulases. *Biochem.*, 35:586-592, 1996.
- BASSO, L. C., ALVES, D. M. G., AMORIM, H. V. *Processos de produção de álcool – Controle e Monitoramento*, 2^a ed. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ – USP. Piracicaba, 1996.
- BASTOS, VALÉRIA DELGADO. *Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias*. BNDES - O Banco Nacional do Desenvolvimento, 34p, 2007.
- BATTIMELLI, A., SOUSBIE, P., TORRIJOS, M. *Determination de la demande chimique en oxygene: micromethode en kit spectroquant[®]*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-4, 2005.
- BAUDEL, HENRIQUE MACEDO. *Pré-tratamento e hidrólise*. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, Dezembro, 2006.
- BAUER, A., BÖSCH, P., FRIEDL, A., AMON, T. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 50-55, 2009.
- BAZÁN, JUAN HERALDO VILOCHE. *Estudo de produção enzimática da dextrana clínica*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993.

- BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:25-58, 1994.
- BELAFI-BAKO, K., KOUTINAS, A., NEMESTOTHY, N., GUBICZA, L. Y WEBB, C. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:155-161, 2006.
- BELGACEM M. N., GANDINI, A. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier, London, 560p, 2008.
- BELGACEM, N. M., BLAYO, A., GANDINI, A. Organosolv lignin a filler in inks, varnishes and paints. *Industrial Crops and Products*, 18, 145-153, 2004.
- BENDIXEN, H. J. Safeguards against pathogens in Danish biogas plants. *Water Science and Technology* 30, 171–180, 1994.
- BERGHEM, L. E. R., PETTERSSON, L. G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation/purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur. J. Biochem.*, 37:21-30, 1973.
- BES, R. S., GAS, G., MOLINIER, J., *et al.* Enhancement of poplar cellulose susceptibility to cellulase enzyme hydrolysis by ozonation. *Ozone Science Eng.*, 11:217-226, 1989.
- BHIKHABHAI, R., JOHANSSON, G., PETTERSSON, G. Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Appl. Biochem.*, 6:336-345, 1984.
- BIANCHI, MARIA LUCIA. *Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv*. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado).
- BIDLACK, J., MALONE, M., BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72: 51-56, 1992.

BISARIA, V. S. (1991). Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. *In: Bioconversion of waste materials to industrial products*, ed. A. M. Martin, 210 – 213. London: Elsevier.

BOISSET, C., FRASCHINI, C., SCHULEIN, M., HENRISSAT, B., CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.*, 66:1444-1452, 2000.

BOLLÓK, M. *Studies on ethanol production on lignocellulosics: SSF and cellulase production*. Department of Agricultural and Chemical Technology. Technical University of Budapest, Hungary, 1999. Tese de doutorado.

BONOMI, ANTONIO. Termo de referência do “*III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise*” - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, Dezembro, 2006.

BOUSSAID, A., SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme Microbial Technol.*, 24:138-143, 1999.

BRANDT, D., HONTZ, L., MANDELS, M. Engineering aspects of the enzymatic conversion of waste cellulose to glucose. *AIChE Symp. Series*, 69:127-133, 1973.

BRETT, C., WALDON, K. (1996b). Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. *In: Physiology and biochemistry of plant cell walls*, Blackk, M. and Charlwood, B. (Eds), Chapman and Hall, 2nd edition, 44-74.

BREUIL, C., CHAN, M., GILBERT, M., SADDLER, J. Influence of β -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrate. *Bioresource Technology*, 39(2), 139-142, 1992.

BRISTOW, J. A., KOLSETH, P. *Paper, structure and properties*. M. Dekker, New York, 1986.

BUFFIERE, P., LOISEL, D. *Dosage des fibres VAN SOEST, Weened*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-14, 2007.

BUFFIERE, P., TORRIJOS, M., SOUSBIE, P., BATTIMELLI, A. *Mesure du potentiel methane et estimation de la biodegradabilite anaerobie*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-16, 2006.

CANEVASCINI, G., GATTEN, C. A. A comparative investigation of various cellulase assay procedures. *Biotechnol. Bioengng.*, 23:1573-1590, 1981.

CARA, C., RUIZ, R., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry*, 41:423–429, 2006.

CARRARD, G., KOIVULA, A., SODERLUND, H. Y BEGUIN, P. Cellulose binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10342-10347, 2000.

CARRERE, H., BUFFIERE, P., LOISEL, D. *Dosages des gaz CO₂, (N₂O), H₂, O₂, N₂, CH₄ par GC-catharomètre avec le GC14*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-10, 2005.

CASTILHOS JUNIOR, A. B. *Simulação do comportamento de um resíduos modelo em aterro sanitário e estudo da evolução bio-físico-química*/ INSA de Lyon - France, 2000.

CAVACO-PAULO, ARTUR. *Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulasas*. Escola de engenharia, Universidade do Minho, 1995. Tese de doutorado.

CHANG, H. M., ALLAN, G. G. Oxidation in lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley Interscience, New York, 433-485, 1971.

CHANG, SHUSHIEN. Lime pretreatment of lignocellulosic biomass. Texas A&M University, 309p, 1999. Doctor of Philosophy.

CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 63-65:3-19, 1997.

- CHANG, V. S., HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochem. Biotechnology*, 86, 5-37, 2000.
- CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74:135–159, 1998.
- CHANG, V. S., NAGWANI, M., KIM, C. H., HOLTZAPPLE, M. T. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94:1–28, 2001.
- CHEN, H., HAYN, M., ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1121:54-60, 1992.
- CHEN, M., XIA, L., XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59, 85–89, 2007.
- CHEN, M., ZHAO, J., XIA, L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers*, 71, 411–415, 2008.
- CHEN, S., WEN, Z., LIAO, W., LIU, C., KINCAID, R., HARRISON, J., ELLIOTT, D., BROWN, M., STEVENS, D. Studies into using manure in a biorefinery concept. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124 (1), 999–1015, 2005.
- CHENG, WEI. *Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials*. College of Engineering and Mineral Resources at West Virginia University. 2001. Master of Science.
- CLARK, T. A., MACKEL, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B:101-110, 1984.
- CNI – Confederação Nacional da Indústria Tratamento do Vinhoto. *Anais do 2º Encontro Nacional*. CNI, Rio de Janeiro, 1982.
- COELHO, S. T.; SILVA, O.C; VARKULYA, A.Jr.; AVELLAR, L.H.N.; FERLING, F.F. *Estado da arte do biogás. Relatório de Acompanhamento*. CENBIO - Centro Nacional de Referência em Biomassa. São Paulo, 2001.

CONVERSE, A. O., OPTEKAR, J. D. A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results. *Biotechnol. Bioeng.*, 42:145-8, 1993.

CORTEZ, L. A. B., LORA, E. S. *Tecnologia de Conversão Energética da Biomassa. Série Sistemas Energéticos II*, Cap. X, Biodigestão, EDUA/EFEI Manaus, 401-459, 1997.

CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. *Reportagem: Presidente Lula inaugura CTBE nesta sexta, 22/01.* 2010. Disponível em <<http://www.bioetanol.org.br/noticias/detalhe.php?ID=MTM0>>. Acesso em 28 de fevereiro de 2010.

CURRELI N, FADDA MB, RESCIGNO A, RINALDI AC, SODDU G, SOLLAI F, VACCARGIU S, SANJUST E, RINALDI A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process Biochemistry*, 32(8), 665-670, 1997.

D.ALMEIDA, M. L. O. *Celulose e papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, 2ªed, v.1, 1988.

DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. *Boletim da SBCTA*, 31(2):249 – 260, 1997.

DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *Fems Microbiology Reviews*, 21:29-42, 1997.

DANTAS, TIRZHÁ LINS PORTO. Decomposição de peróxido de hidrogênio em um catalisador híbrido e oxidação avançada de efluente têxtil por reagente fenton modificado. Florianópolis: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Dissertação (Mestrado).

DAVIES, G. J., DADSON, G. G., HUBBART, R. E., TOLLEY, S. P., DAUTER, Z., WILSON, K. S., HJORT, C., MIKKELSEN, J. M., RASMUSSEN, G., SCHULEIN, M. Structure and function of endoglucanase V. *Nature*, 365:362 364, 1996.

DAVIES, G. J., DODSON, G., MOORE, M. H., TOLLEY, S. P., DAUTER, Z., WILSON, K. S., RASMUSSEN, G., SCHULEIN, M. Structure determination and refinement of the *Humicola insolens* endoglucanase V at 1.5 Å resolution. *Acta. Cryst.*, D52:7-17, 1993.

DAVIES, G., HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3:853-859, 1995.

DECKER, C. H., VISSER, J., SCHREIER, P. β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J. Agric. Food Chem.*, 48:4929-4936, 2000.

DELGENES, J. P., MOLETTA, R., NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb Technol*, 19, 220–225, 1996.

DIAS, MARINA OLIVEIRA DE SOUZA. *Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Dissertação (Mestrado).

DIVNE, C., STAHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T., JONES, T. A. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. *Science*, 265:524-528, 1994.

DIVNE, C., STÅHLBERG, J., TEERI, T. T., JONES, T. A. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.*, 275:309-325, 1998.

DOMÍNGUEZ, J. M. O. *Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense. Madrid, 2003. Tesis de Doutorado.

DORLEANS, M. *Comparaison des techniques FIBERTEC et FIBERBAG pour doser les constituants pariétaux des aliments selon la méthode VAN SOEST*. Cahier des techniques de l'INRA, 40, 45-56, 1998.

DRAUDE, K. M., DRAUDE, C. B., KURNIAWAN. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresour Technol.*, 79, 113–120, 2001.

DU PREEZ, J. C., VAN DRIESSEL, B., PRIOR, B. A. D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters*, 11(2), 131-136, 1989.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol.*, 55:33, 1996.

EKLUND, R., GALBE, M., ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12:225-228, 1990.

ESTERBAUER, H., STEINER, W., LABUDOVA, I., HERMANN, A., HAYN, M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory y pilot scale. *Bioresour Technol.*, 36:51-65, 1991.

FAIX, O., GRUNWALD, C. BEINHOFF, O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWLs) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, H-NMR, and UV spectroscopy. *Holzforschung*, 46:425 - 432, 1992.

FAN, L. T., GHARPURAY, M. M., Y. H. (1987). Design and economics evaluation of cellulose hydrolysis processes. In: *Cellulose hydrolysis Biotechnology Monographs*, 57, 149-187. New York: Springer-Verlag.

FAN, L. T., LEE, Y. H., GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulose and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.*, 23:157-187, 1982.

- FAN, L. T., LEE, Y. H. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.*, 14:2707-2733, 1983.
- FAN, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., HOU, H., REN, B. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 97 (3), 500–505, 2006.
- FANG, J. M., SUN, R. C., SALISBURY, D., *et al.* Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polymer Degradation and Stability*, 66:423–432, 1999.
- FARID, M. A., SHAKER, H. M, EL-DIWANY, A. I. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:421-424, 1983.
- FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter & CO, 613p., 1989.
- FERNANDEZ, N., MORCK, R., JOHNSRUD, S. C., KRINGSTAD, K. P. Carbon-13 NMR study on lignin from bagasse. *Holzforschung*, 44:35 - 38, 1990.
- FERNANDEZ, VANESSA TORNE. *Preparacion, caracterizacion y aplicaciones de carbones activados preparados a partir de lignina kraft*. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2006. Tese (Doutorado).
- FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges and a Future Direction. *Energy & Fuels*, 20, 1727-1737, 2006.
- FLIEGE, R., TONG, S., SHIBATA, A., NICKERSON, K. W., CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12):3826–3829, 1992.

FOLHA ONLINE. Governo decide sobre redução de álcool na gasolina para 20% hoje. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u677385.shtml>>. Acesso em: 11 de janeiro de 2010.

FORESTI, E. Microbiologia da Digestão Anaeróbia. São Paulo, 1999.

FORNEY, L. J., REDDY, C. A., TIEN, M., AUST, S. D. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem., 257(19):11455-11462, 1982.

GAMA, FRANCISCO MIGUEL PORTELA. *Mecanismo bioquímico da ação de celulasas de Trichoderma reesei*. Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 1996. Tese (Doutorado)

GAN, Q., ALLEN, S. J., TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Bioprocess Biotechnol.*, 38:1003-1018, 2003.

GANDINI, A. Polymers from Renewable Resources: A Challenge for the Future of Macromolecular Materials. *Macromolecules*, 41(24), 9491–9504, 2008.

GANDINI, A., BELGACEM, M. N. Chapter 11 - Lignins as Components of Macromolecular Materials Monomers. *Polymers and Composites from Renewable Resources*, 243-271, 2008.

GANESH, K., JOSHI, J. B., SAWANT, S. B. Cellulase deactivation in a stirred reactor. *Biochem. Eng. J.*, 4:137-141, 2000.

GARCIA, DANIELLA DOS REIS. *Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GARCÍA, H. F., MARTÍN, J. F., RODRÍGUEZ, J. J. *Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química*. Ingeniería Química, Octubre, 249-254, 1984.

GARZÓN FUENTES, LAURA LILIANA. *Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré- tratamento com hidróxido de cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2009. Dissertação (Mestrado).

GHOSE, A. P., DAS, K. (1971). *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 1. Berlin: Springer.

GHOSE, T. K. Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of *Trichoderma viride* QM 6a. *Biotechnol. Bioeng.*, 11:239-261, 1969.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.*, 59:257-268, 1987.

GOHEEN, D. W., HOYT, C. H. *Lignin*. Third Edition ed. Kirk- Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, ed. I. John Wiley & Sons. Vol. 14. New York: Wiley-Interscience. 294-313, 1981.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T., GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production for sugarcane. *Energy Policy*, 36 (6), 2086-2097, 2008.

GONÇALVES, A. R., BENAR, P. Hydroxymethylation and oxidation of Organosolv lignins and utilization of the products. *Bioresource Technology*, 79, 103-111, 2001.

GONÇALVES, C. R. S., PEREIRA, S. M., LANNA, I. B., CARDOSO, M., MENDES, M. L. D., EDMUNDS, R. L. Caracterização química do licor negro de eucalipto e sua influência na geração de vapor em caldeiras de recuperação. *35º Congresso e Exposição Anual de Celulose e Papel*, São Paulo, Outubro, 2002

GONZALEZ, A. M., HERRERA, J. P. Y., RODRIGUEZ, A. Caracterización de fracciones de lignina extraídas del licor negro con solventes orgánicos. *Revista Forestal Latinoamericana*, 22 (42), 51-64, 2007.

GONZALEZ-SERRANO, E., CORDERO, T., RODRÍGUEZ-MIRASOL, RODRÍGUEZ, J. J. J. Development of Porosity upon Chemical Activation of Kraft Lignin with ZnCl₂. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 36(11), 4832-4838, 1997.

- GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(1):46-52, 1984.
- GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3):225-231, 1985.
- GOULD, J. M., FREER, S. N. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H₂O₂. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(6):628-631, 1984.
- GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, 6, 1500-1504, 2009.
- GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol. Bioeng.*, 51:375-383, 1996.
- GRUNO, M., VALJAMAE, P., PETTERSEN, G., JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 86:503- 511, 2004.
- GUNATA, Z., VALLIER, M. J. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase from three *Aspergillus* strains. *Biotechnol. Lett.*, 21:219-223, 1999.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.*, 40:663-671, 1992.
- HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58:137 – 161, 1996.
- HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28:384–410, 2005.

HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, A., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Preparation of Samples for Compositional Analysis. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-12, 2005.

HANSON, N.W. Standardized methods of analysis. In: *Hanson, N.W.; ed. Official standardized and recommended methods of analysis*. London: Society for Analytical Chemistry, 1992. 897p.

HARASIMOWICZ, M., ORLUKB, P., ZAKRZEWSKA-TRZNADELA, G. CHMIELEWSKIA, A. G. Application of polyimide membranes for biogas purification and enrichment. *Journal of Hazardous Materials*, 144 (3), 698-702, 2007.

HASSUANI, S. J., LEAL, M. R. L. V., MACEDO, I. C. *Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash* - Piracicaba: PNUD-CTC, Série Caminhos para Sustentabilidade, 2005.

HENRIKSSON, H., STAHLBERG, J., ISAKSSON, R., PETTERSSON, G. The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: A comparison of cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *FEBS Letters*, 390:339-344, 1996.

HENRISSAT, B., DRIGUES, H., VIET, C., SCHULEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology*, 3:722-726, 1985.

HENRISSAT, B., TEERI, T. T., WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.*, 425:352-354, 1998.

HENRY, R. J., CANNON, D. C., WINKELMAN, J. *Clinical chemistry principles and techniques*, 2 ed. Harper and Row Publishers Inc. N.Y. p. 1288, 1974.

HINMAN, N. D., WRIGHT, J. D., HOAGLAND, W., *et al.* Xylose fermentation: an economic analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20/21:391–410, 1989.

HO, N. W. Y., CHEN, Z., BRAINARD, A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective co-fermentation of glucose and xylose. *Applied Environmental Microbiology*, 64:1852–1859, 1998.

HO, N. W. Y., CHEN, Z., BRAINARD, A. P., *et al.* (1999). Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeasts for effective co fermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. *In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Edited by G.T. Tsao, vol. 65. pp. 163 – 192. Berlin: Springer – Verlag.

HOLTZAPPLE, M. T. (1993). Cellulose, hemicellulose, and lignin. *In: Macrae, R., Robinson, R.K., Saddler, J.M. (Eds.), Encyclopedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition*. Academic Press, London, pp. 758–767, 2324–2334, 2731–2738.

HOLTZAPPLE, M. T., CARAM, H. S., HUMPHREY, A. E. Determining the inhibition constants of the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:753-7, 1984.

HOLTZAPPLE, M. T., COGNATA, M., SHU, Y., HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 36:275-287, 1990.

HON, D. N. S., SHIRAISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, inc. 1032 p, 1991.

HOUGHTON, T. P., STEVENS, D. M., PRYFOGLE, P. A., WRIGHT, C. T., RADTKE, C. W. The effect of drying temperature on the composition of biomass. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 153, 4–10, 2009.

HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E. L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2:602-619, 2003.

HOWELL, J. A., MANGAT, M. Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 20:847-863, 1978.

HOWELL, J. A., STUCK, J. D. Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:873-893, 1975.

- HSU, T. (1996). Pretreatment of biomass. *In: Handbook on bioethanol production and utilization*. Wyman C.F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, 179-195.
- HSU, T. A., LADISCH, M. R., TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology* 10(5) :315–319, 1980.
- HUANG, A. A. Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:1421-1433, 1975.
- HUANG, X., PENNER, H. M. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulose system. *J. Agric. Food Chem.*, 39(11), 2096-2100, 2002.
- HYMAN, D., SLUITER, A., CROCKER, D., JOHNSON, D., SLUITER, J., BLACK, S., SCARLATA, C. Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-13, 2007.
- IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 79-83, 2004.
- INGRAM, L. O.; DORAM, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. *FEMS Microbiology Reviews*, 16:235-241, 1995.
- INOVAÇÃO UNICAMP. Reportagem: “Oxitenó apresenta projeto ao BNDES para construir biorrefinaria; quer obter etanol a baixo custo para fabricar produtos químicos”. 2006. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/report/news-oxitenó060807.shtml>>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2010.
- JACOBSEN, J., LYDOLPH, M., LANGE, L. Culture independent PCR: an alternative enzyme discovery strategy. *Journal of Microbiological Methods*, 60:63-71, 2005.
- JENSEN, J. K.; JENSEN, A. B. Biogas and natural gas fuel mixture for the future. *First World Conference and exhibition on biomass for energy and industry*, Sevilla, 2000.

JOAQUIM, ANA PAULA. *Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar*. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado).

JONG, E., REE, R., TUIL, R.F., ELBERSEN, W. Biorefineries for the Chemical Industry – A Dutch point of view. In: *Proceedings of the 2005 annual meeting of the association for the Advancement of Industrial Crops: International Conference on Industrial Crops and Rural Development*, 17-21 September, Murcia, Spain, 2005.

JORGENSEN, H., OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:381-390, 2006.

JUHÁSZ, T., SZENGYEL, Z., RÉCZEY, K., *et al.* Characterization of cellulases and hemicellulases profuced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40:3519-3525, 2005.

KAAR, W. E., HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 18:189–199, 2000.

KAAR, W. E., BRINK, D. L. Summative analysis of nine common. North American woods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 11:479–494, 1991a.

KAAR, W. E., GOOL, L. G., MERRIMAN, M. M., BRINK, D. L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 11:447–463, 1991b.

KAPARAJU, P., SERRANO, M., THOMSEN, A. B., KONGJAN, P., ANGELIDAKI, I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100, 2562–2568, 2009.

- KARLSSON, J., SIIKA-AHO, M., TENKANEN, M., TJERNELD, F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*, 99:63-78, 2002.
- KASTEL'YANOS, O., SINITSYN, A. P., VLASENKO, E. Y. Effects of various factors on the kinetics of cellulose hydrolysis by an enzyme preparation from *Penicillium verruculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31:425-430, 1995.
- KAYA, F., HEITMANN, J. A. JR., JOYCE, T. W. Deactivation of cellulase and hemicellulase in high shear fields. *Cellulose Chem. Technol.*, 30:49-56, 1996.
- KIM, H., HILL, M. K. E, FRICKE, A. L. Preparation of Kraft Lignin from Black Liquor. *Tappi Journal*, 70(12), 112-116, 1987.
- KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology*, 96(18):1994-2006, 2005.
- KIM, SE HOON. *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover*. Texas A&M University, Chemical Engineering, 237p, 2004. Doctor of Philosophy.
- KING, K. W. Enzymatic degradation of crystalline hydrocellulose. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 24:295-298, 1966.
- KIRALLY, C., LEIMER, K. H. E, ROSSELL, C. E. V. *Fermentability of hydrolyzate from sugarcane bagasse* .Report on Semester Project, March-August, 2003.
- KIRK, T. K. CULLEN D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wooddegrading fungi. In: Young, R.A. & Akhtar, M. (eds.): *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, John Wiley & Sons, New York, pp. 273-307.
- KLASS, D. L. (1998). *Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals*. Academic Press, San Diego.

KLINKE, H. B., THOMSEN, A. B., AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 10-26, 2004.

KLYOSOV, A. A., RABINOWITCH, M. L. (1980). Enzymatic conversion of cellulose to glucose: present state of the art and potential. In: Wingard LB, Jr., Berezin IV, Klyosov AA, editors. *Enzyme Engineering: Future Directions*. New York: Plenum Press, 83-165.

KLYOSOV, A. A., SINITSYN, A. P., RABINOWITCH, M. L. (1980). The comparative role of exoglucosidase and cellobiase in glucose formation from cellulose, In: Weetall HW, Royer GP, editors. *Enzyme Engineering*, vol. 5. New York: Plenum Press, p. 153-165.

KOULLAS, D. P., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., *et al.* Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:113-116, 1992.

KRAULIS, P. J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 24:946-950, 1991.

KRAULIS, P. J., CLORE, G. M., NILGES, M., JONES, T. A., PETTERSSON, G., KNOWLES, J., GRONEBORN, A. M. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 28:7241-7257, 1989.

KRISHNA, S. H., PRASANTHI, K., CHOWDARY, G. V., *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry*, 33:825-830, 1998.

KUBO, S., KADLA, J. F. Poly(Ethylene Oxide)/Organosolv Lignin Blends: Relationship between Thermal Properties, Chemical Structure, and Blend Behavior. *Macromolecules*, 37 (18), 6904–6911, 2004.

- KUTSUKI, H., GOLD, M. H. Generation of hydroxyl radical and its involvement in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109(2):320-327, 1982.
- KUZNETSOVA, E., PROUDFOOT, M., SANDERS, S. A., REINKING, J., SAVCHENKO, A., ARROWSMITH, C. H., EDWARDS, A. M., YAKUNIN, A. F. Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *Fems Microbiology Reviews*, 29:263-279, 2005.
- LADISCH, M. R., LIN, K. W., VOLOCH, M., *et al.* Process considerations in enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 5:82-102, 1983.
- LAMO, PAULO DE. *Sistema produtor de gás metano através de tratamento de efluentes industriais*. METHAX/BIOPAQ-CODISTIL, Piracicaba. 1991.
- LARIOS, G., GILBON, A., HUITRON, C. *Sistema celulolítico extracelular de Aureobasidium sp.* Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM México D.F. Curso de Biotecnología de Enzimas Industriales. 16-19 October, Fundación CIEPE, Venezuela, 1984.
- LARSSON, P. T., WICKHOLM, K., IVERSEN, T. A CP/MAS ¹³C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.* 302: 19-25, 1997.
- LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B., *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.*, 24:151-159, 1998.
- LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi, *FEMS Yeast Research.*, 3:133-140, 2003.
- LEE, D., YU, A. H. C., WONG, K. K. Y., *et al.* Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/45:407-415, 1994.

- LEE, W. G., , J. S., SHIN, C. S., PARK, S. C., CHANG, H. N., CHANG, Y. K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Appl Biochem Biotechnol*, 77–79, 547–559, 1999.
- LEE, Y. H., FAN, L. T. Properties and mode of action of cellulase. *Adv. Biochem. Engng.*, 17:131-168, 1980.
- LEE, Y-H., FAN, L. T., FAN, L-S. Kinetics of hydrolysis of insoluble cellulose by cellulase. *Adv. Biochem. Eng.*, 17:131-168, 1980.
- LEMOES, M. A., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, M. R. M., MOTA, M., GAMA, F. M. The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:35-40, 2003.
- LESOING, G., KLOPFENSTEIN, T., RUSH, I., WARD, J. Chemical treatment of wheat straw. *J. Anim. Sci*, 51:263, 1981.
- LI, L. H., FLORA, R. M., KING, K. W. Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111:439-447, 1965.
- LIN, S. H., LO, C. C. Fenton process for treatment of desizing wastewater. *Water Research*, 31, 2050-2056, 1997.
- LINDE, M., JAKOBSSON, E., GALBE, M., ZACCHI, G. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 32 (4), 326–332, 2007.
- LIU, D., ZENG, R., ANGELIDAKI, I. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, 40 (11), 2230–2236, 2006.
- LOISEL, D., BOUGRIER, C., BUFFIERE, P. *Dosage des sucres a l'anthrone*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-5, 2005.

- LONGUE JUNIOR, DALTO. Métodos alternativos para aproveitamentos das hemiceluloses da Madeira de eucalipto na indústria de celulose Kraft. Viçosa: Departamento de Engenharia Florestal. Universidade Federal de Viçosa, 2007. Dissertação (Mestrado).
- LÓPEZ, R., POBLANO, V. M., LICEA-CLAVERIE, A., ALVALOS, M., ALVAREZ-CASTILLO, A., CASTAÑO, V. M. Alkaline surface modification of sugar cane bagasse. *Advanced Composite Materials*, 9(2), 99–108, 2000.
- LU, X., ZHANG, Y., ANGELIDAKI, I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*, 100, 3048–3053, 2009.
- LUND, B., JENSEN, V. F., HAVE, P., AHRING, B. Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. *Antonie Van uwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 69, 25–31, 1996.
- LYND, L. R., CUSHMAN, J. H., NICHOLS, R. J., *et al.* Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, 251:1318–1323, 1991.
- LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58:741–761, 1996.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 66:506–577, 2002.
- MAAS, R. H. W. *Microbial conversion of lignocellulose-derived carbohydrates into bioethanol and lactic acid*. Wageningen University, Netherlands, 2008. Tese (Doutorado).
- MACEDO, I. C. Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil: situação atual, oportunidades e desenvolvimento, *Relatório para o MCT*, Brasília, 2001.
- MACHADO, GILMARA DE OLIVEIRA. *Preparação e caracterização de CMC e CMC graftizada*. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado)

MAGALHÃES, A. P. T. *Biogás: um projeto de saneamento urbano*. São Paulo: Nobel, 1986.

MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.*, 15:804-816, 1999.

MANSOURI, N. E. E., SALVADO, J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and products*, 24(1), 8-16. 2006.

MATA-ALVAREZ, J. Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. IWA Publishing, 2002.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: *Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324, 1994.

MEDVE, J., KARLSSON, J., , D., TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59:621-634, 1998.

MEDVE, J., STÅHLBERG, J., TJERNELD, F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 44:1064-1073, 1994.

MEDVE., J., STÅHLBERG, J., TJERNELD, F. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Appl Biochem Biotechnol.*, 6:39-56, 1997.

MELANDER, C., BENGTSSON, M., SCHAGERLOF, H., TJERNELD, F., LAURELL, T. Y GORTON, L. Investigation of micro-immobilised enzyme reactors containing endoglucanases for efficient hydrolysis of cellodextrins and cellulose derivatives. *Analytica Chimica Acta*, 550:182-190, 2005.

- MES-HARTREE, M. YU, E. K. C., REID, I. D., *et al.* Suitability of aspenwood biologically delignified with *Phlebia rremellosus* for fermentation to ethanol or butanediol. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 26:120-125, 1987.
- MESSNER, R., HAGSPIEL, K., KUBICEK, C. P. Isolation of the β -glucosidase-binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Arch. Microbiol.*, 154:150-155, 1990.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959.
- MONIRUZZAMAN, M., DIEN, B. S., SKORY, C. D., *et al.* Fermentation of corn fibre sugars by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13:341-346, 1997.
- MOOG, F. A., AVILLA, H. F., AGPAOA, E. V., VALENZUELA, F. G. CONCEPCION, F. C. Promotion and utilization of polyethylene biodigester in smallhold farming systems in the Philippines. *Livestock Research for Rural Development*, 9 (2), 1997.
- MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., BEATSON, R. P., SADDLER, J. N. Effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. *Enzyme Microbial Technol.*, 25:644-650, 1999.
- MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., TOUHY, M. G., SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, 64, 113-119, 1998.
- MOSIER, N. S, HALL, P., LADISCH, C. M., LADISCH, M. R. Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulosic proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 23-40, 1999.
- MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., DRESCHER, R., *et al.* *Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production*, Paper 103, BIOT Division, 225th American Chemical Society Meeting, New Orleans, March, 2003a.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., WELCH, G., *et al.* *Corn fiber pretreatment scale-up and evaluation in an industrial corn to ethanol facility*. Paper 6A-04, 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, CO, 2003b.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., , Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96:673-686, 2005.

MOTTA, F. S. *Produza Sua Energia: Biodigestores Anaeróbios*. Recife Gráfica Editora, Recife, 1986.

MUSSATTO, S. I., FERNANDES, M., MILAGRES, A. M. F., ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain *Enzyme and Microbial Technology*, 43 (2), 124-129, 2008.

MUSSATTO, S. I., ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technol.* 93, 1-10, 2004.

NAGWANI, M. *Calcium hydroxide pretreatment of biomass*. M. S. thesis, Texas A&M University, 1992.

NASCIMENTO, E. A., MORAIS, S. A. L., AQUINO, F. J. T., PILO-VELOSO, D. Ozonólise das ligninas organossolve e kraft eucalipto. Parte II: cinética nos meios ácido e básico. *Química Nova*, 21 (5), 578-583, 1998.

NETO, PEDRO DE OLIVA. *Efeito de fatores inibidores na fermentação alcoólica*. XIV Workshop - Produção de Etanol: Qualidade da Matéria-Prima - Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira de São Paulo. Lorena, Abril, 2008.

NIDETZKY, B., STEINER, W., HAYN, M., CLAEYSSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.*, 298:705-710, 1994.

NIGMATULLIN, R., LOVITT, R., WRIGHT, C., LINDER, M., NAKARI-SETALA, T., GAMA, A. Atomic force microscopy study of cellulose surface interaction controlled by cellulose binding domains. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 35:125-135, 2004.

NORTHEY, R.A. Low-cost uses of lignin, emerging technology if materials and chemicals from biomass. *In: ACS Symposium*, Series 476. Washington D.C., 1992.

NREL Research Review, 2003. Acesso em 28/05/2008, disponível em <http://www.nrel.gov/research_review/pdfs/2003/36178.pdf>.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4:171-207, 1997.

OGIER, J. C., BALLERINI, D., LEIGUE, J. P., RIGAL, L., POURQUIÉ, J. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil and Gas Science and Technology- Revue de l'IFP* 54 67-94, 1999.

OHLSON, I., TRAGRDH, G., HAHN-HGERDAL, B. Enzymatic hydrolysis of sodium hydroxide-pretreated sawlog in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:647-653, 1984.

OKAZAKI, M., MOO-YOUNG, M. Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model. *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 637-663, 1978.

OLIVEIRA, M. C., NOGUEIRA, R. F. P., GOMES NETO, J. A., JARDIM, W. F., ROHWEDDER, J. J. R. Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto-fenton. *Química Nova*, 24 (2), 188-190, 2001.

OLIVÉRIO, J. L., HILST, A. G. P. *DHR-Dedini Hidrólise Rápida – Revolutionary Process for Producing Alcohol from Sugar Cane Bagasse*, XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, Janeiro/fevereiro, 2005.

OLSSON, L., JORGENSEN, H., KROGH, K. B. R., ROCA, C. (2005). Bioethanol production from lignocellulosic material. In: *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. S. Dimitriu (Ed), Marcel Dekker, New York, 957-993.

ONDREY, GERALD. The path to biorefineries. Chemical engineering, 27-30, 2006. Disponível em: <www.che.com>. Acesso em 22 de fevereiro de 2009.

OOSHIMA, H., BURNS, D. S., CONVERSE, A. O. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng*, 36, 446-452, 1990.

OSORIOA, F., TORRESB, J. C. Biogas purification from anaerobic digestion in a wastewater treatment plant for biofuel production. *Renewable Energy*, 34(10), 2164-2171, 2009.

PADUKONE, N. (1996). Advanced process options for bioethanol production. In: *Handbook on bioethanol production and utilization*. Wyman C.F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, 315-323.

PAIN, B. F., HEPHERD, R. Q. Anaerobic digestion of livestock wastes. In: PAIN, B.F. HEPHERD, R.Q. (Eds.), Anaerobic Digestion of Farm Waste. NIRD Technica Bulletins, Reading, 9-14, 1985.

PALMQVIST, E., GRAGE, H., MEINANDER, N. Q., HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng*, 63,46-55, 1999.

PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Tecnol.*, 74, 25-33, 2000b.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I. Inhibition and detoxification. *Bioresoure. Technol.*, 74:17-24, 2000a.

PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107:65-72, 2004.

- PAN, G. X., BOLTON, J. L., LEARY, G. J. Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:5283–5288, 1998.
- PATEL, M. M., BHATT, R. M. Optimization of the alkaline peroxide pretreatment for the delignification of rice straw and its applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53(3), 253-263, 1991.
- PATHAK, A. N., GHOSE, T. K. Cellulases-1. Sources technology. *Process Biochem.*, 8:35-38, 1973.
- PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. 3ª. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.
- PECORA, VANESSA. *Implantação de uma unidade demonstrativa de geração de energia elétrica a partir do biogás de tratamento do esgoto residencial da usp - estudo de caso*. USP: Instituto de Eletrotécnica e Energia, Universidade de São Paulo, 2006. Dissertação de mestrado,
- PEITERSEN, N., ROSS, E. W. Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng.*, 21:997-1017, 1979.
- PERES, CLARITA SCHVARTZ. Painel 5 do “*Workshop Tecnológico sobre vinhaça*” - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. Jaboticabal, Outubro, 2007.
- PERRY, R. H.; GREEN, D. W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook* (7th Edition), McGraw-Hill, pp 2581, 1997
- PETERSSON, A., THOMSEN, M. H. HAUGGAARD-NIELSEN, H., THOMSEN, A. B. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass and Bioenergy*, 31 (11-12), 812-819, 2007.
- PHILLIPS, J. A., HUMPHREY, A. E. (1983). An overview of process technology for the production of liquid fuels and chemicals feedstocks via fermentation. In D. L. Wise (Ed.), *Organic Chemicals from Biomass* (pp. 249–304). Menlo Park: Benjamin/Cummings.

PHOWCHINDA, O., DELIA-DUPUY, M. L., STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 17, 237-242, 1995.

PINTO, CLÁUDIO PLAZA. *Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável*. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Dissertação (mestrado).

PLAYNE, M. J. Increased digestibility of bagasses by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 26:426-433, 1984.

PRESTON, T.R.; RODRÍGUEZ, L. Low-cost biodigesters as the epicenter of ecological farming systems. In: *Proceedings Biodigester Workshop March 2002*. Disponível em: <<http://www.mekarn.org/procbiod/prest.htm>>. Acesso em: 25 fevereiro de 2010.

PRICE, E. C., CHEREMISINOFF, P. N. Biogas: Production and Utilization. *Ann Arbor Science*, Michigan, 1981.

PURI, V. P., PEARCE, G. R. Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:480-485, 1989.

QUENTIN, M., VAN DER VALK, H., VAN DAM, J., DE JONG, E. Cellulose-binding domains: Tools for innovation in cellulosic fiber production and modification. *Applications of enzymes to lignocellulosics*, 855:132-155, 2003.

RABELO, SARITA CÂNDIDA. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

RABINOVICH, M. L., MELNICK, M. S., BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry-Moscow* ,67:850-871, 2002.

RAMIREZ, ROCIO SIERRA. Long-term lime pretreatment of poplar wood. Texas A&M University. 2005. Master of Science.

- RAMOS, L. P., BREUIL, C., SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme Microbial Technol.*, 15:19-25, 1993a.
- RAMOS, L. P., NAZHAD, M. M., SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme Microb. Technol.*, 15:821-831, 1993b.
- RANATUNGA, T. D., JERVIS, J., HELM, R. F., MCMILLAN, J. D., HATZIS, C. Toxicity of hard-wood extractives toward *Saccharomyces cerevisiae* glucose fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 19:1125–1127, 1997.
- REESE, E. T. (1992). Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. In: *Loewus FA, Runeckles VC, editors. Recent Advances in Phytochemistry*. New York: Plenum Press, 311-362.
- REESE, E. T., RYU, D. Y. Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbial Technol.*, 2:239-240, 1980.
- REESE, E. T., SIU, R. G. H., LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, 59:485-497, 1950.
- REICHERT, J. S., PETE, R. H. Peroxide Bleaching of Groundwood. *TAPPI J.* 32(3): 97, 1949.
- RICARDO, C. P., TEIXEIRA A. *Enzimas*. Lisboa: Didáctica Editora, 1976, 160 p.
- RILEY, C., *Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass*, AIChE Spring Conference, 2002.
- RIVERA, E. A. C., RABELO, S. C., GARCIA, D. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: Determining optimal enzyme loading using neural networks. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010. [DOI: 10.1002/jctb.2391](https://doi.org/10.1002/jctb.2391).

- RODRIGUES, J. A. D., RATUSZNEI, S. M., CAMARGO, E. F. M., ZAIAT, M. Influence of agitation rate on the performance of an anaerobic sequencing batch reactor containing granulated biomass treating low-strength wastewater. *Advances in Environmental Research*, 7(2), 405-410, 2003.
- ROLZ, C., LEON, R., ARRIOLA, M. C., *et al.* Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbial.*, 52:607-611 1986.
- ROSILLO-CALLE, F., BAJAY, S. V., ROTHMAN, H. *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2005.
- ROSSELL, C. E. V *et al.* Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. *Sugar Industry / Zuckerindustrie* 131, 2006b.
- ROSSELL, C. E. V. *Fermentação do hidrolisado*. In: FAPESP. Workshop do Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo: Hidrólise. São Paulo, 2006a. Disponível em <http://www.apta.sp.gov.br/cana/>. Acesso em dezembro de 2007.
- ROUVINEN, J., BERGFORS, T., TEERI, T., KNOWLES, J. K. C., JONES, T. A. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*. 249:380-386, 1990.
- RUDOLF, A., ALKASRAWI, M., ZACCHI, G., LIDEN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 195–204, 2005.
- RYU, D. D. Y., S. B., TASSINARI, T., MACY, C. Effect on compression milling on cellulose structure and on enzyme hydrolysis kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:1047-1067, 1982.
- SAHA, B. C., COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 32(10), 971-977, 2008.
- SAHLSTROM, L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 87, 161–166, 2003.

SALAZAR, R. F. S., SILVA, G. L. P., SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. UNICAMP, 1-6, 2005.

SANDGREN, M., SHAW, A., ROPP, T. H., WU, S., BOTT, R., CAMERON, A. D., STÅLBERG, J., MITCHINSON, C., JONES, T. A. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 308:295-310, 2000.

SCHLITTLER, L. A. F. S. *Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar*. Rio Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado).

SCHULEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J Biotechnol.*, 57:71-81, 1997.

SEGAL, L., CREELY, J. J., MARTIN, A. E., CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29, 786-764, 1959.

SENYO, W. C., CREAMER, A. W., WU, C. F., LORA, J. H. The use of organosolv lignin to reduce press vent formaldehyde emissions in the manufacture of wood composites. *Forest Products Journal*, 46 (6), 73-77, 1996.

SERRA, G. E., CEREDA, M. P., FERES, R. J. F., BERTOZO, M. T., VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, XCIII, 6, 336-341, 1979.

SEWALT, V., GLASSER W., BEAUCHEMIN K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. *J Agri Food Chem*, 45:1823–1828, 1997.

SHEEHAN, J., ADEN, A., PAUSTIAN, K., KILLIAN, K., BRENNER, J., WALSH, M., NELSON, R. Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology*, 7 (3–4), 117–146, 2003.

SHEEHAN, J., HIMMEL, M. Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the US Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol. *Biotechnology Progress*, 15, 817-827, 1999.

SIERRA-ALVAREZ, R., LETTINGA, G. The methanogenic toxicity of wastewater lignins and lignin related compounds. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 50:443–455, 1991.

SILVA, R. N., MONTEIRO, V. N., ALCANFOR, J. D. X., *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23(3):337-341, 2003.

SINITSYN, A. P., MITKEVICH, O. V., GUSAKOV, A. V., KLYOSOV, A. A. Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polym.*, 10:1-14, 1989.

SJÖSTRÖM, E. Carbohydrate degradation products from alkaline treatment of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 1(1), 61-64, 1991.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-12, 2005d.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Total Solids in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-6, 2005a.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-8, 2005b.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-16, 2008.

SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-12, 2005c.

SMET, E., VAN LANGENHOVE, H., DE BO, I. The emission of volatile compounds during the aerobic and the combined anaerobic/aerobic composting of biowaste. *Atmospheric Environment*, 33, 1295–1303, 1999.

SOMMER, P. Conversion of hemicellulose and D-xylose into ethanol by the use of thermophilic anaerobic bacteria. *Technical University of Denmark*, 64, 1998. Ph.D. Thesis.

SOUSBIE, P., CONTE, T. *Dosage des Acides Gras Volatils par chromatographie gazeuse avec CPG3900 et CP8400 VARIAN*. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-63, 2009.

SOUZA, C. F., CAMPOS, J. A., SANTOS, C. R., BRESSAN, W. S., MOGAMI, C. A. Produção volumétrica de metano – dejetos de suínos. *Ciênc. agrotec.*, 32 (1), 219-224, 2008.

SOUZA, CRISTIANO SOARES. *Derivatização química e caracterização de uma lignina do bagaço da cana de açúcar*. Uberlândia: Instituto de Química. Universidade de Uberlândia. 2006. Dissertação (Mestrado).

SOUZA, M. E. Criteria for the Utilization, Design and Operation of UASB Reactors. *Water Science and Technology*, 18 (12), 55-69, 1986.

SREENATH, H. K., JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology*, 72:253–260, 2000.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 35-53, 1976.

- STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 5, 441-445, 1989 a.
- STRATFORD, M. Yeast flocculation: Calcium specificity. *Yeast*, 5, 487-496, 1989 b.
- SUN, J. X., SUN, X. F, SUN, R. C., SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 56:195–204, 2004.
- SUN, R. C., TOMKINSON, J., MA, P. L., LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydrate Polymers*, 42:111-122, 2000.
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83:1–11, 2002.
- SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 10(5/6):367-375, 1996.
- SZCZODRAK, J., ILCZUK, Z., ROGALSKI, J., *et al.* Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment. *Biorechnol. Bioeng.*, 28:504-510 1986.
- SZENGYEL, ZSOLT. *Ethanol form wood cellulose enzyme production*. Sweden: Dept. of Chemical Engineering, Lund University, 2000. Doctoral dissertation.
- TAFDRUP, S. Viable energy production and waste recycling from anaerobic digestion of manure and other biomass materials. *Biomass & Bioenergy*, 9, 303–314. 1995.
- TAHERZADEH, M. J., NIKLASSON, C., LIDÉN, G. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fedbatch fermentation. *Bioresource Technology*, 69:59–66, 1999.
- TALINLI, I., ANDERSON, G. K. Interference of hydrogen peroxide on the standard COD test. *Water Research*, 26, 107-110, 1992.

TANAHASHI, M., TAKADA, S., AOKI, GOTO, T., HIGUCHI, T., HANAI, S. *Characterization of explosion wood.1. Structure and physical properties*. Wood Research, 9, 36-31, 1983.

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry. TAPPI test methods T 204 om-88: solvent extractives of wood and pulp. *Atlanta: Tappi Technology Park*, 1996.

TARKOW, H., FEIST, W. C. (1969). A Mechanism for Improving the Digestibility of *Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid NH₃*. Advance Chemistry Series 95. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197–218.

TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotech.*, 15:160-167, 1997.

TEIXEIRA, S. C. G., MATHIAS, L., CANELA, M. C. Recuperação de sílica-gel utilizando processos oxidativos avançados: uma alternativa simples e de baixo custo. *Quimica Nova*, 26 (6), 931-933, 2003.

TEMPLETON, D., EHRMAN, T. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-14, 1995.

TENGERDY, R. P., SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:169-179, 2003.

TENKANEN, M., NIKU-PAAVOLA, M. L., LINDER, M., VIKARI, L. *Cellulase in food processing*. In: Handbook of food enzymology. New York: Marcel Dekker Inc. p 879-915, 2003.

TERRI, T. T. Crystalline cellulose degradation: a new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.*, 15:160-167, 1997.

Tese (Doutorado).

THOMPSON, D. N, CHEN, H. C. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Biores. Techno.* 9, 155-163, 1992.

- THOMSEN, M. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (5), 598– 606, 2005.
- TOLAN, J. S., FOODY, B. Cellulases from submerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 65:41-67, 1999.
- TOMME, P., WARREN, R. A. J., GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbiology Physiology*, 37:1-81, 1995.
- TORRY-SMITH, M. P., SOMMER, P., AHRING, B. K. Purification of bioethanol effluent in a UASB reactor system with simultaneous biogas formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (1), 7–12, 2003.
- TRAN, A. V., CHAMBERS, R. P. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23:191–197, 1986.
- TRIANA, O., LEONARD, M., SAAVEDRA, F., *et al.* *Atlas: Del bagazo de la caña de azucar.* México, GEPLACEA, 143p, 1990.
- UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. *Agência ambiental dos EUA reconhece etanol de cana como biocombustível avançado.* Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=BF4E1F8C-A8C0-4E1A-A0F0-208D2513D8DE>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2010.
- USAMI, S., KIRIMURA, K., IMURA, M., MORIKAWA, S. Cellular localization of the constitutive β - glucosidase in *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.*, 70:185-187, 1990.
- VALE, A.T., BRASIL, M. A. M., LEO, A. L. Caracterização da madeira e da casca de *Sclerolobium paniculatum*, *Dalbergia miscolobium* e *Pterodon pubescens* para uso energético. In: *3º Encontro de Energia no Meio Rural*, Campinas/SP, 2003.
- VAN DYKE Jr, H. H. Enzymatic hydrolysis of cellulose: a kinetic study, Ph.D. Thesis, MIT Press, 1972.

- VAN SOEST, P. J. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *J. Asso. Anal. Chem.* 46 (5), 829-835, 1963.
- VERMA, M. L. (1983). Practical aspects of treatment of crop residues. In *The utilization of fibrous agricultural residues*, Pearce, G. R., ed. Australian Government Publishing Service, Canberra, A.C.T., pp. 85-99.
- WALKER, L. P., WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, 36:3-14, 1991.
- WATANABE, T., SATA, T., YOSHIOKA, S., KOSHIJIMA, T., KUWAHARA, M. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, 209:651-659, 1992.
- WEIL, J. R. *Unified model for hydrolytic effects during cellulose pretreatment*. Eng., Purdue University, 1992. Dissertação (Mestrado).
- WEREKO-BROBBY, C. Y., HAGEN, E. B. Biomass conversion and technology. *Editora John Wiley & Sons*, 2-224. New York, 2000.
- WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(3):305 – 317, 1988.
- WOOD, T. M. Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5:111-137, 1975.
- WOOD, T. M., BHAT, K. M. (1988). Methods for measuring cellulase activities, pp. 87-116. In: *W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), Methods in enzymology*, Vol. 160. Academic Press, San Diego, CA.
- WOODWARD, J., LIMA, M., , N. E. The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochem. J.*, 255:895-899, 1988.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities and Commercial Challenges. *Annu. Rev. Energy Environ.*, 24:189-226, 1999.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.*, 50:3-16, 1994.

WYMAN, C. E. Twenty years of trials, tribulations and research progress in bioethanol technology - Selected key events along the way. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-3, 5-21, 2001.

XUA, J., CHENG J. J., SHARMA-SHIVAPPAA, R. R., BURNSB, J. C. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*, 101 (8), 2900-2903, 2010.

YAMAMOTO, H., HORII, F. In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation of celluloses I α and I β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) ^{13}C NMR spectrometry. *Cellulose* 1:57-66, 1994.

YAMASHITA, Y., SHONO, M., SASAKI, C., NAKAMURA, Y. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydrate Polymers*, 79 (4), 914-920, 2010.

YANG, B., BOUSSAID, A., MANSFIELD, S. D., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(6):678-684, 2002.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, 22 (1), 12-16, 1991.

ZALDIVAR, J., MARTINEZ, A., INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 68, 524-530, 2000.

ZAUTSEN, R., ROSSELL, C. E. V. *Fermentability of hydrolizate from sugar cane bagasse*. Semester Project, october 2003 - june 2004.

ZHANG, M., SU, R., QI, W., HE, Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 160, 1407–1414, 2010.

ZHANG, Y. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (5), 367–375, 2008.

ZHU, LI. Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. Texas A&M University. 2005. Tese (Doutorado).

ZICARI, S. *Removal Of Hydrogen Sulfide From Biogas*. Faculty of the Graduate School, Cornell University. Wyoming, 2003. Thesis (Master)

ZINDER, S. H., CARDWELL, S. C., ANGUISH, T., LEE, M., KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester *Methanothrix sp.* as an important acetoclastic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 796-807, 1984.

ZOU, J. Y., KLEYWEGT, G. J., STÅHLBERG, J., DRIGUEZ, H., NERINCKX, W., CLAEYSENS, M., KOIVULA, A., TERRI, T. T., JONES, A. T. Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*. *Structure*, 7:1035-1045, 1999.

APÊNDICE I

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DA BIOMASSA

A determinação do teor de umidade da biomassa foi baseado no procedimento padrão do NREL “Determination of Total Solids in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005a). O objetivo desta análise foi medir a quantidade de água e outros componentes voláteis à 105°C presentes nas amostras de bagaço.

1. Procedimento

Béqueres de 100,0 mL foram previamente secos a 105°C em uma estufa, deixados em um dessecador para esfriarem até temperatura ambiente, e posteriormente pesados em uma balança analítica (M_1). Amostras homogeneizadas de aproximadamente 6,00 g de bagaço foram pesadas nos béqueres e tiveram suas massas anotadas (M_2). As amostras foram então levadas para uma estufa a 105°C e secas até peso constante (mudança de $\pm 0,1\%$ na umidade atual em cima de 1 h de reaquecimento). É aconselhável secar pelo menos 24 h. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em um dessecador para que esfriassem até a temperatura ambiente. Os béqueres contendo o bagaço absolutamente seco foram então pesados tendo suas massas anotadas (M_3). Para todas as amostras de bagaço foram realizados ensaios em triplicata.

2. Cálculo

Para o cálculo do teor de umidade do bagaço temos:

$$\% \text{ umidade} = \left(1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \right) \times 100 \quad \text{I-1}$$

M₁: massa do béquer vazio, em g

M₂: massa do béquer + amostra úmida, em g

M₃: massa do béquer + amostra absolutamente seca, em g

Inversamente, o índice de sólidos totais da amostra é calculado como:

$$\% \text{ sólidos totais} = \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \times 100 \text{ ou } \% \text{ sólidos totais} = 100 - \% \text{ umidade} \quad \text{I-2}$$

APÊNDICE II

DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA NA BIOMASSA

O procedimento padrão do NREL “Preparation of Samples for Compositional Analysis” (HAMES *et al.*, 2005) foi utilizado como referência para determinação da distribuição do tamanho de partícula na biomassa. O objetivo foi separar granulometricamente o material que será utilizado nos experimentos de pré-tratamento e hidrólise, denominado como bagaço peneirado.

1. Procedimento

Foram utilizadas peneiras da série de Taylor de 12, 16, 24, 32, 42, 60 e 80 mesh para a separação do material. As peneiras foram inicialmente pesadas e posteriormente empilhadas na seguinte ordem, começando na parte inferior: a bandeja inferior, 80, 60, 42, 32, 24, 16 e 12 mesh.

Aproximadamente 80,00 g do bagaço foram adicionados na parte superior da série de peneiras e estas foram presas em um agitador eletromagnético sendo agitadas durante 15 min. Após este período, as peneiras foram pesadas para determinar a massa retida em cada uma delas.

As frações retidas nas peneiras de 16 a 60 mesh (-12+60 mesh) foram misturadas, homogeneizadas, e teve seu teor de umidade determinado segundo metodologia descrita no apêndice I. O material foi armazenado em bolsas hermeticamente fechadas dentro do freezer.

Para a determinação da fração mássica retida, foram realizados ensaios em triplicata. O processo foi repetido inúmeras vezes até que uma quantidade de substrato mínima fosse obtida para a realização dos experimentos (aproximadamente 1,0 kg).

2. Cálculo

Para determinação da fração mássica retida (exemplo para a fração da peneira de 12 mesh) temos:

$$\text{Fração}_{+12} \% = \left(\frac{M_{+12}}{M_{+12} + M_{+16} + M_{+24} + M_{+32} + M_{+42} + M_{+60} + M_{+80} + M_{-80}} \right) \times 100 \quad \text{II-1}$$

M_{+12} : massa das partículas retidas na peneira de 12 mesh, em g

M_{+16} : massa das partículas retidas na peneira de 16 mesh, em g

M_{+24} : massa das partículas retidas na peneira de 24 mesh, em g

M_{+32} : massa das partículas retidas na peneira de 32 mesh, em g

M_{+42} : massa das partículas retidas na peneira de 42 mesh, em g

M_{+60} : massa das partículas retidas na peneira de 60 mesh, em g

M_{+80} : massa das partículas retidas na peneira de 80 mesh, em g

M_{-80} : massa das partículas que passaram na peneira de 80 mesh ou terra, em g

APÊNDICE III

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS NA BIOMASSA

Para determinação do teor de cinzas na biomassa, o estudo foi baseado no procedimento padrão do NREL “Determination of Ash in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005b) e BIANCHI (1995). A finalidade era quantificar o material inorgânico na biomassa, estrutural ou extraível, como parte da composição total.

1. Preparação das amostras

Primeiramente foi determinado o teor de umidade das amostras usando o procedimento padrão do NREL descrito no apêndice I. Esta umidade foi descontada da massa da amostra pesada para realização do experimento. Para determinação do teor de cinza é aconselhável à lavagem do bagaço uma vez que os teores de terra são consideravelmente altos e podem interferir na análise, levando a um resultado superestimado.

2. Procedimento

Cadinhos de porcelana de 50,0 mL foram numerados e pesados em uma balança analítica tendo suas massas anotadas (M_1). Pesou-se cerca de 1,00 g do material, descontando o teor de umidade, nos cadinhos previamente pesados (M_2). O material foi carbonizado na mufla a 800°C por 20 min. Após este período, a mufla foi desligada e esperou-se cerca de 1 h até que o material resfriasse. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e efetuada a pesagem do material. A calcinação foi repetida por mais 15 min para se verificar a constância do peso (M_3). As análises foram realizadas em triplicata.

3. Cálculo

Para o cálculo do teor de cinza temos:

$$\% \text{ cinza} = \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \times 100 \quad \text{III-1}$$

M₁: massa do cadinho calcinado vazio, em g

M₂: massa do cadinho + massa do bagaço descontando o teor de umidade, em g

M₃: massa do cadinho com cinzas, em g

APÊNDICE IV

DETERMINAÇÃO DOS EXTRATIVOS NA BIOMASSA

Este procedimento de determinação dos extrativos na biomassa foi baseado nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005c) e na norma TAPPI T 204 om-88 “Solvent Extractives of Wood and Pulp” (TAPPI, 1996). A determinação dos extrativos apresenta duas finalidades: quantificar os extrativos para a análise compositiva e remover o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos para que não haja interferência nestas etapas analíticas.

1. Preparação

Primeiramente foi determinado o teor de umidade do bagaço de acordo com o procedimento descrito no apêndice I. Adicionou-se aproximadamente 4,00 g da amostra, descontando o teor de umidade, ao cartucho de extração tendo sua massa devidamente anotada (M_1).

Após montagem do extrator, o cartucho preenchido pela biomassa foi devidamente introduzido no tubo de extração do soxhlet.

2. Análise da amostra

Adicionou-se 200,0 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento ajustado para que fornecesse no mínimo 10 sifonações por hora. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor.

Após extração em água, as amostras foram novamente submetidas à extração, utilizando

aproximadamente 200,0 mL de álcool etílico em cada balão do extrator. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração (aproximadamente 8 horas).

Ao término da extração, os sólidos foram transferidos, tão quantitativamente quanto possível, para um funil de Buchner, lavados com aproximadamente 100,0 mL de etanol, filtrados a vácuo e secos em uma estufa a 105°C até massa constante, determinada em balança analítica (M_2).

3. Cálculo

Para o cálculo do teor de extrativos no bagaço temos:

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{IV-1}$$

M_1 : massa do bagaço descontado o teor de umidade, em g

M_2 : massa do bagaço livre de extrativos, em g

APÊNDICE V

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS, LIGNINA, GRUPOS ACETIL, FURFURAL E 5-HIDROXIMETILFURFURAL NA BIOMASSA

Estas análises foram baseadas nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy” (HYMAN *et al.*, 2007), “Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass” (TEMPLETON e EHRMAN, 1995), “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (SLUITER, 2008), “Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples” (SLUITER *et al.*, 2005d), nas normas ASTM “Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography” (ASTM E1758, 1996) e “Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass” (ASTM E1721, 1995) e segundo SALAZAR *et al.* (2005). O objetivo é a quantificação de celobiose, glicose, xilose, arabinose, lignina (lignina solúvel e insolúvel), ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

1. Preparação da amostra

Primeiramente foi determinado o teor de umidade da biomassa como descrito no *apêndice I*. O teor de umidade deve ser menor que 10%, caso contrário uma nova secagem do material deve ser realizada. Para execução do procedimento de quantificação, o material foi moído e passado por uma peneira de 20 mesh. Partículas retidas na peneira eram novamente moídas para que a composição química do material não fosse alterada.

Tamanhos de partículas maiores podem conduzir a resultados errôneos no conteúdo de lignina e carboidratos. É extremamente importante que o bagaço esteja livre de extrativos, sendo necessária a execução da experimentação descrita no *apêndice IV*.

2. Hidrólise ácida concentrada

Pesou-se aproximadamente 0,30 g de cada amostra de bagaço (M_1), descontando o teor de umidade, em tubos de ensaio devidamente etiquetados. Adicionou-se 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) em cada tubo. Os tubos foram encubados em um banho termostático a 30°C por 1 h. Usando um bastão de vidro, as amostras foram agitadas a cada 5-10 min sem remover os tubos do banho.

3. Hidrólise ácida diluída

Depois de decorrido o tempo da hidrólise ácida concentrada, os tubos foram removidos do banho termostático e o conteúdo transferido quantitativamente para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso, 84,0 mL de água destilada, sendo a concentração ácida do meio diluída para 4%. Foi preparado um “branco” com ácido sulfúrico a 4%. Para a completa hidrólise dos oligômeros, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e elásticos e colocados em uma autoclave. As amostras e o branco foram autoclavadas por 1 h a 121°C e 1,1 bar. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio.

4. Análise da lignina insolúvel

Os hidrolisados ácidos foram filtrados em funis utilizando papéis de filtro. As frações líquidas foram armazenadas para quantificação da lignina solúvel, carboidratos, conteúdo acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Os sólidos retidos foram lavados com água destilada em abundância, aproximadamente 1,5 L, transferidos para pesa-filtros e secos em estufa a 100° C até massa constante. Após este período, estes foram removidos da estufa e deixados esfriar até temperatura ambiente dentro do dessecador, determinando posteriormente suas massas (M_2). Parte deste material insolúvel é constituído de cinzas, uma vez que estas não são solúveis em ácido. Assim, para que não haja uma superestimação dos dados de lignina insolúvel, o teor de cinzas determinado para cada material, segundo a metodologia descrita no *apêndice III*, deve ser descontando na análise de lignina insolúvel.

5. Análise da lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível. Transferiu-se 1,0 mL de cada hidrolisado ácido para balões volumétricos de 100 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. A leitura da solução foi realizada a 280 nm utilizando celas de quartzo. A leitura deve ser realizada até 6 h após hidrólise.

6. Preparação das amostras para a curva de calibração dos carboidratos e produtos de decomposição

Curvas de calibração são necessárias para quantificação dos carboidratos e produtos de decomposição por utilizando CLAE. A curva foi realizada utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após injeção no cromatógrafo. Os resultados são utilizados para calcular uma concentração desconhecida de açúcares dado uma área.

Foram preparadas soluções padrões de concentração de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

7. Análise dos carboidratos

Alíquotas de cada hidrolisado, obtido após a etapa de filtração da hidrólise ácida, foram neutralizadas com carbonato de cálcio a pH entre 5-6. O carbonato deve ser adicionado lentamente para evitar a formação de espuma. Os hidrolisados neutralizados foram filtrados diretamente em vials utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore).

As amostras e padrões foram injetados no cromatógrafo utilizando para análise a coluna Sugar-Pak I (Waters). As áreas dos picos correspondentes as hexoses e as pentoses foram utilizadas para calcular as massas de glicana e xilana, respectivamente. Os fatores usados para converter açúcares monoméricos em anidromônmeros são 0,90 para a glicose e 0,95 para a

celobiose. De maneira similar, xilose e arabinose tiveram suas correções efetuadas utilizando um fator de 0,88. Estes fatores são calculados baseados na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise ácida (KAAR *et al.*, 1991 a,b).

As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose foram determinadas a partir de curvas de calibração obtida com padrões analíticos descritas no *item 6*.

As condições de análise foram:

- Volume de injeção: 10 µL
- Fase móvel: água deionizada filtrada e desgaseificada
- Taxa de fluxo: 0,5 mL/min
- Temperatura do forno: 90°C
- Temperatura do detector: 40°C
- Detector: índice de refração
- Tempo de execução: 15 minutos

Caso houvesse a detecção de celobiose em concentrações maiores que 3 mg/mL, as análises eram repetidas uma vez que isso significa uma hidrólise incompleta. Picos que apresentam tempos de retenção abaixo da celobiose podem indicar altos níveis de produtos de degradação dos açúcares na amostra, e isto está diretamente relacionado com a etapa de hidrólise.

8. Teor de ácido acético

Para quantificação do ácido acético nas amostras foi utilizado à coluna Biorad Aminex HPX-87H equipada com uma pré-coluna. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico a 0,01 mol/L filtrada por filtros de poros de 0,45 µm e posteriormente desgaseificada.

Através da determinando da concentração de ácido acético é possível transformá-la em teores de hemicelulose, utilizando para isso um fator de conversão de 0,72 (KAAR *et al.*, 1991 a,b).

As condições para a análise do ácido acético foram:

- Volume de injeção: 40 µL

- Taxa de fluxo: 0,60 mL/min
- Temperatura do forno: 35°C
- Comprimento de onda: 215 nm
- Temperatura do detector: temperatura ambiente
- Detector: índice de refração
- Tempo de execução: 25 minutos

9. Teor de furfural e 5-hidroximetilfurfural

Para as análises de furfural e de 5-hidroximetilfurfural, as amostra filtradas em membrana foram injetadas em uma coluna Nova-Pak C18, Waters, Milford, MA, utilizando como fase móvel uma solução de acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético), previamente filtrada e degaseificada. As áreas dos picos correspondentes ao furfural e 5-hidroximetilfurfural foram utilizadas para calcular sua concentração na amostra utilizando para isso um fator de conversão de 1,37 e 1,2, respectivamente.

As condições para a análise foram:

- Volume injeção: 20 µL
- Taxa de fluxo: 0,80 mL/min
- Temperatura do forno: 30°C
- Comprimento de onda: 280 nm
- Temperatura do detector: temperatura ambiente
- Detector: UV-VIS
- Tempo de execução: 20 minutos

10. Cálculos

Lignina insolúvel:

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \left(\left(\frac{M_2}{M_1} \right) \times 100 \right) - \% \text{ cinzas} \quad \text{V-1}$$

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

M_2 : massa de lignina insolúvel seca, em g

% cinzas: teor de cinzas determinado segundo metodologia descrita no apêndice III

Lignina solúvel:

$$C \text{ lignina solúvel} = (41,87.(A_T - A_{PD}) - 0,3279).10^{-3} \quad \text{V-2}$$

$$A_{PD} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2 \quad \text{V-3}$$

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{C \text{ lignina solúvel} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot FD}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{V-4}$$

A_T : absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm;

A_{PD} : absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) calculado através da Equação V-3, cujas concentrações C_1 e C_2 foram determinadas previamente por CLAE e ε_1 e ε_2 são as absortividades da furfural e HMF (146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹);

$C_{\text{lignina solúvel}}$: concentração da lignina solúvel obtido através da Equação V-2 e V-3, em g/L

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

FD: fator de diluição para leitura da absorbância, 100

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

Lignina total:

$$\% \text{ lignina total} = \% \text{ lignina insolúvel} + \% \text{ lignina solúvel} \quad \text{V-5}$$

Carboidratos:

$$\% \text{ açúcares} = \left(\frac{C_{CLAE} \cdot CA \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{V-6}$$

C_{CLAE} : concentração do açúcar quantificado por CLAE, em g/L

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos, 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

Conteúdo de acetato:

$$\% \text{ acetato} = \left(\frac{C_{A \text{ CLAE}} \cdot FC \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{V-7}$$

$C_{A \text{ CLAE}}$: concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do ácido acético, 0,72

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

Furfural:

$$\% \text{ furfural} = \left(\frac{C_{F \text{ CLAE}} \cdot FC \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{V-8}$$

$C_{F \text{ CLAE}}$: concentração de furfural quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do furfural, 1,37

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

5-Hidroximetilfurfural:

$$\% \text{ hidroximetilfurfural} = \left(\frac{C_{H \text{ CLAE}} \cdot FC \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{V-9}$$

$C_{H \text{ CLAE}}$: concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do 5-hidroximetilfurfural, 1,20

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

APÊNDICE VI

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Esta análise foi determinada de acordo com recomendações da IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD e BHAT, 1988; ADNEY e BAKER, 1996). O objetivo foi determinar a atividade da enzima celulase como atividade de papel de filtro e expressa em FPU por volume de enzima original.

A quantificação dos açúcares liberados no meio reacional foi determinada de acordo com o método DNS descrito por MILLER (1959) e BAZÁN (1993).

1. Preparo do tampão citrato

Para o preparo do tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8, 10,5 g de ácido cítrico monohidratado foram dissolvidos em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,3 (aproximadamente 2,5 g). O volume da solução foi completado para 50 mL e em seguida, mediu-se o pH. Quando necessário, mais hidróxido de sódio foi adicionado à solução para que o pH atingisse 4,5 e assim, obtivéssemos uma solução tampão de citrato pH 4,5 a 1 mol/L. Para obter a concentração de 0,05 mol/L, a solução de 50 mL foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Neste momento o pH subiu para 4,8.

2. Preparação da solução de DNS

O reagente DNS é preparado através da adição de 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água destilada. Após dissolução total dos sólidos, adicionou-se 306,0 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 mL de fenol (fundido) e 8,3 g de meta-

bissulfito de sódio sendo o volume aferido para 1416 mL com água destilada. Porém, verificou-se que deste modo o reagente sofria degradação se estocado por algum período, mesmo armazenado em frasco âmbar.

Assim, o reagente DNS passou a ser preparado segundo BAZÁN (1993). Dissolveu-se 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. Adicionou-se a esta mistura 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio. O reagente foi guardado em um frasco âmbar para proteger da luz e nomeado como solução mãe de DNS.

Para a quantificação dos ART, foram transferidos 100 mL da solução mãe em um béquer sendo adicionados 30,6 g de tartarato de sódio e potássio, submetido a aquecimento até total dissolução dos sólidos. Após dissolução, o volume foi aferido para 146 mL, estando assim a solução pronta para uso.

3. Construção da curva padrão de glicose

Para construção de uma curva padrão, amostras com concentrações conhecidas de glicose foram preparadas e após aplicação do método DNS, lidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm.

Partiu-se de uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL, preparada em tampão citrato 0,05 mol/L, sendo realizada diluições de 0 a 10,0 mg/mL. As reações com DNS foram realizadas adicionando em cada tubo de ensaio 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições de glicose previamente diluídas em tampão citrato. Foi adicionado aos tubos 3,0 mL do reagente DNS preparado segundo a metodologia descrita no *ítem 2*. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente para parar a reação.

Vale ressaltar que ao preparar um novo reagente DNS, uma nova curva-padrão era construída.

4. Determinação da atividade da celulase

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução de celulase de diluição de 1:20. De posse dessa solução, efetuou-se 5 novas diluições em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8.

Em cada tubo de ensaio adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato e em seguida, 50 mg de papel de filtro enrolado, tomando o devido cuidado para que este ficasse saturado pelo tampão. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50°C para que a temperatura se equilibrasse. Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL de cada uma das enzimas previamente diluídas em tampão citrato e os tubos foram encubados por exatamente 60 minutos.

Ao final deste período, os tubos foram removidos e a reação enzimática parada imediatamente com a adição de 3,0 mL do reagente DNS preparado segundo a metodologia descrita no *item 2*. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente para parar a reação sendo invertidos posteriormente para a homogeneização da solução. Quando a polpa de papel restante da reação de hidrólise foi assentada, a cor formada foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

Durante as reações, parte da concentração da glicose pode vir da própria enzima e/ou do substrato, uma vez que o complexo enzimático pode conter açúcares nutrientes, assim como as extremidades da celulose podem, às vezes, ser quantificadas como glicose antes de todo o ataque da enzima. Por esta razão, os tubos controle, que consistem (a) na enzima sem substrato e (b) no substrato sem enzima, são incluídos durante as análises das amostras e têm seus valores de absorbância subtraídos dos valores das absorbâncias lidas em cada um dos tubos reacionais.

Assim, a quantificação da glicose através do método DNS envolve três categorias de reações: tubos das amostras a serem quantificadas; tubos do branco reacional, para zerar o espectrofotômetro; e os tubos controle da enzima e substrato.

Para o preparo do tubo do branco reacional, adicionou-se 1,5 mL do tampão citrato e após os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNS como descrito anteriormente. Para o preparo dos tubos controle da enzima, adicionou-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições da enzima, totalizando 5 tubos controle, que ao final do tempo reacional,

tiveram suas reações paradas com a adição do DNS, e então reagidas como descrito anteriormente. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de papel de filtro enrolado, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNS.

5. Cálculo

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

De posse das leituras das absorbâncias obtida após hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, traçou-se uma reta onde se relaciona a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL dessa enzima diluída, determinando assim a atividade enzimática da Equação VI-1

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]}$$
VI-1

Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

APÊNDICE VII

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -GLICOSIDASE

Esta análise foi determinada como recomendado pela IUPAC (WOOD e BHAT, 1988). O objetivo foi medida da atividade da β -glicosidase através de uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressá-la em unidades de celobiose (CBU) por volume de enzima original.

Para a quantificação da glicose liberada após hidrólise da celobiose, foi utilizado o método enzimático Glicose GOD-PAP, descrito por HENRY (1974).

1. Preparo do tampão citrato

Para o preparo do tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 foi realizado segundo metodologia descrita no *apêndice VI item 1*.

2. Construção da curva padrão de glicose

Para construção de uma curva padrão, amostras com concentrações conhecidas de glicose foram preparadas e após aplicação do método Glicose GOD-PAP estas foram lidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm.

Prepararam-se, a partir de uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL, soluções de glicose de 0 a 10,0 mg/mL, com espaçamento de 1,0 mg/mL, que após reações com o mono-reagente, foram lidas no espectrofotômetro.

3. Quantificação da glicose

Para a quantificação da glicose, adicionou-se 20 μ L de cada uma das amostras em tubos de ensaio previamente identificados e 2,0 mL do mono-reagente. Os tubos foram mantidos em um banho termostático a 37°C por 10 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada. Ao término da reação foi efetuada a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, foi utilizado um tubo de reação “branco” com apenas o reagente.

Quando necessário, diluições das amostras foram efetuadas para possibilitar a leitura, já que a reação, segundo o fabricante, é linear até 500 mg/dL. Outra observação relevante do fabricante é que, quando a leitura do branco apresenta absorbância acima de 0,250, o mono-reagente deve ser descartado, já que isso indica uma deterioração do reativo de trabalho. A cor final da reação é estável por 60 minutos.

4. Determinação da atividade da β -glicosidase

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução da enzima β -glicosidase de diluição 1:1000. De posse dessa solução, foram feitas 4 novas diluições em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8.

Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e estes foram colocados em um banho termostático a 50°C para que a temperatura se equilibrasse. Após 10 minutos, foi adicionado em cada tubo, 1,0 mL da solução de celobiose 15 mmol/L e os tubos foram encubados por 30 minutos. Ao término da reação, os tubos foram imersos em um banho de água fervente por exatamente 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo.

Para a determinação da concentração de glicose liberada por cada solução de enzima diluída, utilizou-se o método de quantificação Glicose GOD-PAP como descrito no *item 3*. Ao final da reação de quantificação, adicionou-se 0,2 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72% em cada tubo de ensaio para garantir que a reação tenha sido terminada.

Foram preparados 4 tubos controle da enzima, onde se adicionou 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e 1,0 mL do tampão citrato. Ao final do tempo reacional, aplicou-se o método enzimático Glicose GOD-PAP como descrito no *apêndice VII*. Ao tubo controle do substrato adicionou 1,0 mL do substrato celobiose e 1,0 mL do tampão citrato que ao final de 30 minutos de reação também foi analisado pelo método enzimático Glicose GOD-PAP.

5. Cálculo

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

De posse das leituras das absorbâncias obtida após hidrólise enzimática da celobiose e utilizando a equação obtida pela curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração de glicose liberada pela enzima em cada um dos ensaios.

Assim, traçou-se uma reta onde se relaciona a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL dessa enzima diluída, determinando então a atividade enzimática da β -glicosidase como mostra a Equação VII-1

$$\begin{aligned} \text{CBU/mL} &= \frac{0,5}{(0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \\ \text{CBU/mL} &= \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]} \end{aligned} \quad \text{VII-1}$$

Uma unidade da atividade de β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, $0,5/0,18016 \mu\text{mol}$ de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação.

APÊNDICE VIII

EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Esta análise foi determinada com o objetivo de determinar o pH ótimo do complexo celulolítico celulase.

1. Preparo do tampão citrato a diferentes pHs

Para analisar o efeito do pH na atividade enzimática, foram preparadas soluções de tampão citrato 0,05 mol/L à diferentes valores de pH: 1,58; 3,12; 4,10; 4,80; 5,21; 5,75; 6,14 e 6,99. O preparo do tampão citrato foi realizado segundo a metodologia descrita no *item 1 apêndice VI*.

2. Construção da curva padrão de glicose

A curva padrão de glicose foi realizada segundo a metodologia descrita no *apêndice VI item 3*.

3. Determinação do efeito do pH

A análise foi realizada utilizando a enzima celulase a uma concentração 3% (v/v). As reações foram realizadas com três categorias de tubo: tubos reacionais contendo as soluções tampão em diferentes valores de pH, tubo do branco para zerar o espectrofotômetro e os tubos controle da enzima e do substrato.

Para cada tubo reacional, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato 0,05 mol/L com os diferentes valores de pH. Em seguida, adicionou-se 50 mg de papel de filtro enrolado, tomando o

devido cuidado para que este ficasse saturado pelo tampão. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50°C para que a temperatura se equilibrasse. Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL da enzima previamente diluída no tampão citrato e os tubos foram misturados e encubados por exatamente 60 minutos.

Ao final deste período, os tubos foram removidos e a reação enzimática parada imediatamente com a adição de 3,0 mL do reagente DNS preparado segundo a metodologia descrita no *apêndice VI item 2*. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Quando a polpa restante do papel foi assentada, as amostras foram espectrofotometricamente lidas.

Para os tubos do branco, adicionou-se 1,5 mL de cada um das soluções tampão citrato e após os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNS como descrito anteriormente. Para os tubos controle da enzima, foi adicionado em cada tubo, 1,0 mL do tampão citrato com diferentes valores de pH e 0,5 mL da enzima diluída, onde ao final do tempo reacional, aplicou-se o método DNS. Os tubos controle do substrato foram reagidos com 1,5 mL do tampão citrato em diferentes pH e 50 mg de papel de filtro enrolado, que ao final de 60 minutos também foi analisado pelo método DNS.

4. Cálculo

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

De posse das leituras das absorbâncias obtida após hidrólise enzimática do papel filtro, a diferentes valores de pH, e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose, foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, foi traçada uma reta onde se relaciona a atividade relativa da enzima referente à massa de glicose liberada em função dos valores de pH da solução tampão, determinando assim, o efeito do pH na atividade enzimática.

APÊNDICE IX

EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Esta análise apresenta como objetivo determinar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

1. Construção da curva padrão de glicose

A curva padrão de glicose foi realizada segundo a metodologia descrita no *apêndice VI item 3*.

2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para analisar o efeito da temperatura na atividade enzimática, foram providenciados banhos termostáticos e estes mantidos nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, sendo o pH do meio mantido constante e igual a 4,8. A análise foi realizada com a enzima celulase a uma concentração de 3% (v/v).

Foram realizadas reações para os tubos com as amostras a serem analisadas, tubos do branco reacional e tubos controle da enzima e substrato.

Para cada tubo da amostra, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8; preparado segundo a metodologia descrita no *apêndice VI item 1*, e 50 mg de papel de filtro enrolado. Os tubos foram colocados nos banhos termostáticos com as temperaturas determinadas para equilibrar. Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL da enzima previamente diluída no tampão citrato e os tubos foram misturados e encubados por exatamente 60 minutos.

Ao final deste período, os tubos foram removidos e a reação enzimática parada imediatamente com a adição de 3,0 mL do reagente DNS, devidamente preparado segundo a

metodologia descrita no *apêndice VI item 2*. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Quando a polpa restante assentou-se, a cor formada foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

Para os tubos do branco reacional, adicionou-se 1,5 mL de tampão citrato sendo cada tubo encubado em uma das temperaturas pré-determinadas, que após 60 minutos de reação teve a glicose liberada quantificada pelo método DNS. Para os tubos controle da enzima, adicionou-se a cada tubo 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL da enzima diluída sendo encubados nas diferentes temperaturas. Ao final do tempo reacional aplicou-se o método DNS. Os tubos controle do substrato foram reagidos com 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de papel de filtro enrolado, sendo encubados nas diferentes temperaturas, que ao final de 60 minutos de reação, também foi analisado pelo método DNS.

3. Cálculo

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

De posse das leituras das absorbâncias obtida após hidrólise enzimática do papel filtro, a diferentes valores de temperatura, e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose, foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, foi traçada uma reta onde se relaciona a atividade relativa da enzima referente à massa de glicose liberada em função dos valores de temperatura reacionais, determinando assim, o efeito da temperatura na atividade enzimática.

APÊNDICE X

NEUTRALIZAÇÃO DA CAL APÓS PRÉ-TRATAMENTO

Este procedimento foi adaptado de RAMIREZ (2005) e apresenta dois objetivos: determinar o consumo da cal ao final da etapa de pré-tratamento e neutralizar a amostra para deixá-la pronta para os procedimentos analíticos que podem ser afetados pelo pH e pelo recobrimento do material pelo reagente.

1. Preparação da solução de HCl

Para o preparo da solução de HCl 5,0 mol/L, 414,5 mL de ácido clorídrico 37% foi adicionado a um béquer já contendo uma certa quantidade de água. Após o resfriamento da amostra, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L que teve seu volume aferido com água destilada.

2. Padronização da solução de HCl com carbonato de sódio

Aproximadamente 1,5 g do carbonato de sódio foram transferidos para um pesa filtro e seco a 150 °C por aproximadamente 2 horas sendo posteriormente transferido e resfriado em um dessecador.

Aproximadamente 0,20 g do Na_2CO_3 foi pesado em erlenmeyers de 250 mL e dissolvidos com 50 mL de água destilada. Adicionou-se 3 gotas de verde de bromocresol ao frasco que posteriormente foi titulado com a solução de HCl até que a coloração começasse a mudar. Neste momento, o ponto de equivalência ainda não foi atingido.

Ferveu-se brandamente a solução por 2-3 minutos, sendo deixada para esfriar a temperatura ambiente continuando, sem seguida, a titulação até a mudança da cor para verde anotando-se o volume gasto de ácido (V_{HCl}). Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Foi determinada uma correção para o indicador utilizando uma solução de 100 ml de NaCl 2,5 mol/L e 3 gotas do indicador. Ferveu-se a solução por 2-3 minutos, sendo deixada para esfriar e completou-se a titulação que teve o volume anotado ($V_{\text{HCl Branco}}$). Este volume de HCl foi então subtraído do volume de HCl gasto nas titulações das amostras com carbonato de sódio.

3. Preparação da amostra

Uma vez que o tempo de pré-tratamento foi decorrido, o material foi deixado resfriar até temperatura ambiente e transferido quantitativamente para béqueres de 1 L utilizando água destilada. O volume final foi de cerca de 750 mL.

4. Procedimento

O béquer contendo o material foi colocado sobre um agitador magnético sendo utilizada uma barra magnética para a agitação. Mergulhou-se um eletrodo de pH dentro deste béquer para medir o pH da suspensão.

Um sistema de titulação foi montado e a bureta preenchida com a solução de HCl 5 mol/L padronizada. Lentamente o ácido foi adicionado até o ponto final de neutralização (pH 7,0). Foi deixado descansar por aproximadamente 1 h para que toda a cal pudesse desprender da biomassa e para assegurar que o pH estivesse realmente estabilizado. Caso houvesse alteração do pH, uma maior quantidade de ácido era adicionada e um novo descanso dado ao material. O volume utilizado foi então anotado (V_{HCl}).

5. Cálculos

Padronização do HCl

$$C_{HCl} = \frac{1 \text{ mol } Na_2CO_3}{2 \text{ mol } HCl} \times \frac{m_{Na_2CO_3}}{MM_{Na_2CO_3} \times (V_{HCl} - V_{HCl \text{ Branco}})} \quad X-1$$

$m_{Na_2CO_3}$: massa do carbonato de sódio, g

$MM_{Na_2CO_3}$: massa molar do carbonato de sódio, 106 g/mol

V_{HCl} : volume de HCl gasto na titulação, L

$V_{HCl \text{ Branco}}$: volume de HCl gasto na titulação do branco, L

Consumo de cal no pré-tratamento

$$m_{Ca(OH)_2 \text{ NR}} = \frac{1 \text{ mol } Ca(OH)_2}{2 \text{ mol } HCl} \times \frac{C_{HCl} \times V_{HCl}}{1000} \times MM_{Ca(OH)_2} \quad X-2$$

$$m_{Ca(OH)_2 \text{ R}} = m_{Ca(OH)_2 \text{ i}} - m_{Ca(OH)_2 \text{ NR}} \quad X-3$$

$m_{Ca(OH)_2 \text{ NR}}$: quantidade de cal não reagida, g

$m_{Ca(OH)_2 \text{ R}}$: quantidade de cal reagida, g

$m_{Ca(OH)_2 \text{ i}}$: quantidade de cal inicial definida pelo planejamento, g

C_{HCl} : concentração da solução de HCl padronizada, mol/L

V_{HCl} : volume de HCl utilizado na titulação, mL

$MM_{Ca(OH)_2}$: massa molar do $Ca(OH)_2$, 74,10 g/mol

APÊNDICE XI

RENDIMENTO DA ETAPA DE PRÉ-TRATAMENTO, HIDRÓLISE E GLOBAL

A lignina, hemicelulose e celulose são fracionadas geralmente em duas partes durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise, como mostra a Figura XI.1.

Para o fracionamento da lignina, parte dela é solubilizada durante o pré-tratamento e outra parte fica remanescente no material pré-tratado, obtendo assim as frações A_L e C_L .

No caso da hemicelulose, observa-se uma solubilização durante a etapa de pré-tratamento mas também uma hidrólise desta durante a etapa de hidrólise enzimática. Além disso, parte deste material fica presente no resíduo após hidrólise. Assim, as frações A_H , B_H e C_H podem ser observadas.

Para a celulose, observa-se o mesmo fracionamento ocorrida para a hemicelulose, diferenciando principalmente na quantidade do polissacarídeo solubilizado/hidrolisado durante o pré-tratamento e hidrólise enzimática. Assim, as frações A_C , B_C e C_C são obtidas.

Outros componentes da biomassa, como os extrativos e cinzas, também são fracionados em duas partes (A_{EC} e C_{EC}).

Os cálculos dos rendimentos para cada um dos constituintes e etapas estão dispostos a seguir:

Rendimento da deslignificação:

$$R_{DL} = \frac{\text{massa de lignina remanescente após pré-tratamento}}{\text{massa da lignina na biomassa bruta}} = \left(\frac{A_L}{A_L + C_L} \right) \times 100$$

Assim, a fração de lignina removida durante a pré-tratamento é:

$$1 - R_{DL} = \left(\frac{C_L}{A_L + C_L} \right) \times 100$$

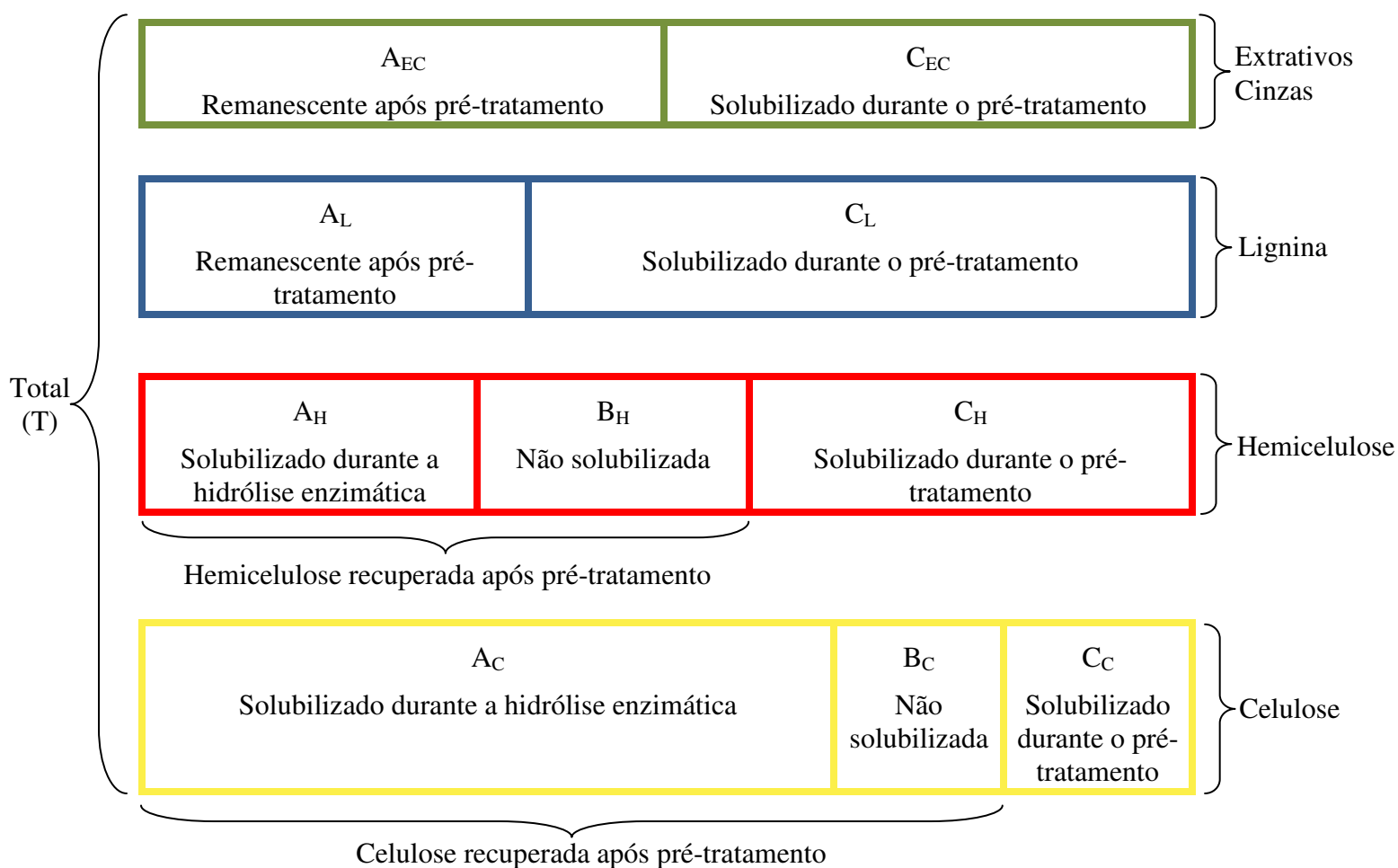


Figura XI.1: Nomenclatura e definição das frações usadas para calcular o rendimento de pré-tratamento, hidrólise e total.

Rendimento de pré-tratamento para a hemicelulose

$$R_{PH} = \frac{\text{massa de hemicelulose recuperada após pré - tratamento}}{\text{massa de hemicelulose na biomassa bruta}} = \left(\frac{A_H + B_H}{A_H + B_H + C_H} \right) \times 100$$

Rendimento de pré-tratamento da celulose:

$$R_{PC} = \frac{\text{massa de celulose recuperada após pré-tratamento}}{\text{massa de celulose na biomassa bruta}} = \left(\frac{A_C + B_C}{A_C + B_C + C_C} \right) \times 100$$

Em relação ao rendimento de hidrólise da celulose, optou-se por calcular o rendimento apenas dos açúcares fermentescíveis uma vez que só estes serão utilizados no processo fermentativo. Assim, não foi considerado neste cálculo a celobiose obtida após hidrólise da celulose.

Rendimento de hidrólise para a hemicelulose:

$$R_{HC} = \frac{\text{massa de hemicelulose hidrolisada}}{\text{massa de hemicelulose na biomassa pré-tratada}} = \left(\frac{A_H}{A_H + B_H} \right) \times 100$$

Rendimento de hidrólise para a celulose (considerando apenas a glicose):

$$R_{HC} = \frac{\text{massa de celulose hidrolisada (considerando apenas a glicose)}}{\text{massa de celulose na biomassa pré-tratada}} = \left(\frac{A_C}{A_C + B_C} \right) \times 100$$

Para o rendimento global foi considerado todos os açúcares obtidos após cada etapa, ou seja, foi considerado, no caso do rendimento global da celulose, não apenas a glicose, mas também a celobiose obtida.

Rendimento global da hemicelulose:

$$R_{GH} = \frac{\text{massa de hemicelulose obtida após pré-tratamento e hidrólise}}{\text{massa de hemicelulose na biomassa bruta}} = \left(\frac{A_H}{A_H + B_H + C_H} \right) \times 100$$

Rendimento global da celulose:

$$R_{GC} = \frac{\text{massa de celulose obtida após pré-tratamento e hidrólise}}{\text{massa de celulose na biomassa bruta}} = \left(\frac{A_C}{A_C + B_C + C_C} \right) \times 100$$

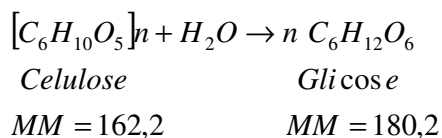
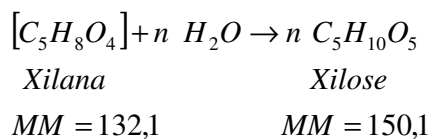
Duas observações importantes sobre os cálculos são:

1. O rendimento de pré-tratamento, hidrólise e total estão relacionados:

$$R_{GH} = R_{PH} \times R_{HH}$$

$$R_{GC} = R_{PC} \times R_{HC}$$

2. As reações de hidrólise são:



Assim, os açúcares monoméricos, isto é, xilose e glicose, podem ser expressas como poliméricos açúcares, glicana e xilana, utilizando um fator de conversão:

$$Xilana = Xilose \times \frac{132,1}{150,1}$$

$$Glucana = Glicose \times \frac{162,2}{180,2}$$

Esses fatores de conversão são usados para expressar A_G e A_H como carboidratos poliméricos e manter a coerência nas definições dos rendimentos.

APÊNDICE XII

DETERMINAÇÃO DA DQO

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Determination de la demande chimique en oxygene: micromethode en kit spectroquant[®]” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (BATTIMELLI *et al.*, 2005). O objetivo é determinar a DQO nos licores de pré-tratamento e no resíduo sólido da hidrólise enzimática sendo estes valores necessários para a determinação da quantidade de amostra a ser adicionada no reator para produção de biogás.

1. Princípio do método

A Demanda Química de Oxigênio é a quantidade de oxigênio produzido por dicromato de potássio após reação com substâncias oxidáveis contidas em 1 L de amostra de água. A amostra de água é oxidada por uma solução ácida de dicromato de potássio a quente com sulfato de prata utilizado como catalisador. Após reação, ocorre a mudança da coloração laranja para verde, sendo então analisada por espectrofotometria. A Equação XII-1 mostra a relação obtida.

1 mol $K_2Cr_2O_7$ corresponde a 1,5 mol O_2

$$\text{mg/L DQO} = \text{mg/L } O_2 \quad \text{XII-1}$$

2. Reagentes e materiais

Para a determinação do DQO foi utilizados o kit comercial spectroquant[®]. Os tubos são comercializados prontos, contendo dicromato de potássio, ácido sulfúrico, sulfato de prata e sulfato de mercúrio. Além disso, foi utilizado para as análises água Milli-Q, uma placa de mineralização e um espectrofotômetro com software para determinação de DQO.

3. Procedimento

O reator de mineralização foi pré-aquecido a 150°C. As amostras a serem analisadas foram devidamente diluídas com água Milli-Q. A necessidade da diluição se deve ao fato de que quanto maior a concentração de produtos oxidantes, mais esverdeada fica a solução de dicromato. A diluição deve ser feita até que a solução adicionada ao tubo de análise não se apresente com tal coloração. A coloração esverdeada só poderá aparecer após o aquecimento, para que não haja problemas na leitura do espectrofotômetro.

Após diluição das amostras, 2,0 mL da solução foi adicionada ao tubo reacional que imediatamente foi submetido ao aquecimento na placa de mineralização por 2 h a temperatura de 150°C.

Após este intervalo, os tubos foram colocados sob um rack, sem agitação, para esfriar até temperatura ambiente e assim submetida à leitura espectrofotométrica a 620 nm.

4. Cálculos

O espectrofotômetro utilizado nesta análise (HACH DR/2000) forneceu a resposta em mg O₂/L solução. Assim:

$$DCO = E \times FD \quad \text{XII-2}$$

E: leitura espectrofotométrica, mg O₂/L

FD: Fator de diluição

APÊNDICE XIII

DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS) E DA MATÉRIA ORGÂNICA (MO)

Este procedimento foi baseado em norma internas do INRA, Narbonne. O objetivo é determinar a matéria seca (MS) e a matéria orgânica (MO) das amostras sólidas utilizadas para a produção de biogás e para análise do lodo utilizado no processo de biodigestão anaeróbia.

1. Determinação da matéria seca (MS)

Para determinação da matéria seca, cadinhos de porcelana previamente numerados foram deixados em uma estufa a 105°C por 24 h. Após este período, os mesmos foram transferidos para um dessecador e deixados até atingirem a temperatura ambiente. Os cadinhos foram pesados e tiveram suas massas anotadas (M_1). Foram adicionados a eles uma quantidade da amostra a ser analisada, sendo posteriormente pesados (M_2) e secos em uma estufa a 105°C por 24h.

Após este intervalo, os cadinhos foram novamente transferidos para o dessecador e após atingirem a temperatura ambiente, estes foram novamente pesados (M_3), determinando-se assim a matéria seca das amostras (MS).

2. Determinação da matéria orgânica (MO)

A matéria seca obtida após a análise do *item 1* foi carbonizada em uma mufla a 600°C por 5 horas. Após este período, o material foi transferido para uma estufa a 105°C e posteriormente para um dessecador, até atingir a temperatura ambiente. Após este período, o material foi pesado em balança analítica e determinado assim o teor de matéria orgânica.

3. Cálculo

Matéria seca (MS)

$$\% MS = \left(\frac{M_2}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{XIII-1}$$

M₁: amostra úmida, em g

M₂: massa após secagem a 105°C, em g

Matéria orgânica (MO)

$$MV = \left(\frac{M_2 - M_3}{M_1} \right)$$

$$\% MO = (1 - MV) \times 100 \quad \text{XIII-2}$$

M₁: amostra úmida, em g

M₂: massa após secagem a 105°C, em g

M₃: massa após queima a 550°C, em g

APÊNDICE XIV

DOSAGEM DOS ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Dosage des Acides Gras Volatils par chromatographie gazeuse avec CPG3900 et CP8400 VARIAN” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (SOUSBIE *et al.*, 2009). O objetivo é quantificar os ácidos graxos voláteis: ácido acético (C₂), propiônico (C₃), Iso-butírico (IC₄), butírico (C₄), iso-valérico (IC₅) e valérico (C₅) nos licores de pré-tratamento e no resíduo líquido após produção de biogás.

1. Equipamento

Para quantificação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo a gás da marca Varian 3900 com detector de ionização de chama e equipado com software GalaxyTM. Foi utilizada a coluna Alltech FFAP ECTM 1000, a uma temperatura máxima de 250°C, com o nitrogênio como gás de arraste e o hidrogênio como gás de chama.

2. Preparo das amostras

2.1. Solução de padrão interno (PI)

O padrão interno foi preparado adicionando 1,0 g de ácido etil-2-butírico em 1 litro de água destilada acidificada a 5% (v/v) com ácido fosfórico.

2.2. Padrão de ácidos graxos voláteis (C₂ a C₅)

Foi preparada uma solução mãe contendo aproximadamente 1,0 g de cada um dos ácidos (C₂ a C₅) em um litro de água destilada. Após esta preparação, diluições foram realizadas a partir

dessa solução e os padrões foram então preparados adicionando a cada 1,0 mL destes padrões diluídos, 1,0 mL do padrão interno preparado, como descrito no *ítem 2.1*. Os padrões foram injetados no cromatógrafo nas condições descritas no *ítem 1* com um tempo de corrida de 1h 30 min. Estes foram utilizados na quantificação dos ácidos voláteis presentes nas amostras.

2.3. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas misturando 1,0 mL de cada licor de pré-tratamento com 1,0 mL do padrão interno. As amostras foram injetadas no cromatógrafo com tempos de corrida de 1h 30 min. Através das curvas padrões foi possível calcular a concentração dos ácidos voláteis presente nas amostras.

APÊNDICE XV

QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES UTILIZANDO ANTRONA

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Dosage des sucres a l’anthrone” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (LOISEL *et al.*, 2005). O objetivo é quantificar os açúcares nos licores de pré-tratamento.

1. Preparação das amostras

1.1. Preparação da solução de ácido antrona

Para o preparo da solução de antrona, dissolveu-se a frio 200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado (97-98%).

1.2. Preparação das soluções padrão de glicose

Preparou-se uma solução estoque de 1,0 g/L de glicose. Foram realizadas diluições, obtendo-se soluções de concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L de glicose.

2. Quantificação dos açúcares

Para quantificação dos açúcares, aqueceu-se o banho termostático a 98°C. Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 mL de amostra previamente diluída e 2,0 mL do reagente antrona (ítem 1.1). As amostras foram incubadas em um banho de gelo fundente e posteriormente homogeneizadas. Após este período, imergiram-se os tubos no banho de água fervente por 10 minutos. A reação foi parada pela imersão dos tubos em um banho com água e gelo fundente.

As amostras foram lidas em um espectrofotômetro utilizando água Milli-Q como branco. O comprimento de onda utilizado foi de 625 nm.

O cálculo foi realizado baseando-se na curva padrão obtida, sendo possível assim determinar a concentração de açúcares nos licores de pré-tratamento.

APÊNDICE XVI

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR VAN SOEST

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Dosage des fibres VAN SOEST, Weened” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (BUFFIERE e LOISEL, 2007). O objetivo é determinar as componentes da parede celular através do método sequencial de VAN SOEST.

1. Preparo dos reagentes

Para determinação dos componentes do material lignocelulósico foram utilizados sacos de nylon da marca GERHARDT e soluções detergente e ácida, cuja descrição é apresentada a seguir.

Solução detergente neutra (FDN)

Reagentes	Massa (g)
Dodecil sulfato de sódio	30
Tetraborato de sódio	6,81
EDTA	18,61
Hidrogeno fosfato de sódio penta hidratado	4,56

Os sais foram dissolvidos em água destilada e aquecer suavemente para promover a dissolução. Quando necessário, o pH da solução foi ajustado para 6,9 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, tendo ao final o volume aferido para 1,0 L.

Solução detergente ácida (FDA)

Reagentes	Quantidade
brometo de hexadeciltrimetilamônio	20,0 g
Ácido sulfúrico 96%	28,8 mL

Os compostos foram dissolvidos em água destilada e transferidos para um balão volumétrico que teve seu volume aferido para 1,0 L com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico

Para a análise da componente lignina, foi utilizado uma solução de ácido sulfúrico 72%.

2. Procedimento

Obtenção da fração FDN

Os sacos e béqueres utilizados foram previamente secos a 105 °C por 24 h. Após secagem e transferência para um dessecador até temperatura ambiente, os béqueres (T) e os sacos (TS) foram pesados e tiveram suas massas anotadas.

Aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi inserida dentro do saco que foi novamente pesado juntamente com o béquer (MI). Cada amostra teve a matéria seca e orgânica determinada anteriormente como descrito no *apêndice XIII*.

Cada saco, devidamente preenchido pela amostra e prensado por um bastão de vidro, foi colocado no carrossel de metal e inserido dentro de um béquer contendo 360 mL de solução de FDN e esferas de vidro previamente aquecidas a 100°C.

Após 1 h de reação, os sacos foram submetidos a três lavagens com água destilada quente durante cinco minutos, quando então foram retirados, escorridos e deixados imersos em

acetona por três a cinco minutos. A secagem dos sacos foi realizada dentro do béquer previamente pesado em estufa de ar forçado a 105°C por 24 horas.

Em seguida, após, atingirem a temperatura ambiente, estes foram novamente pesados (amostra + saco + béquer) tendo a massa anotada (M_1).

Obtenção da fração FDA

Após secagem depois da análise com FDN, os sacos foram novamente transferidos para o carrossel sendo inseridos em um béquer contendo 360 mL da solução FDA sendo mantida sob aquecimento por 1 h.

Após este intervalo, os sacos foram submetidos a três lavagens com água destilada quente durante cinco minutos, quando então foram retirados, escorridos e deixados imersos em acetona por três a cinco minutos. A secagem dos sacos foi realizada dentro do mesmo béquer utilizado na análise anterior, em estufa de ar forçado a 105°C por 24 horas.

Em seguida, após, atingirem a temperatura ambiente, estes foram novamente pesados (amostra + saco + béquer) tendo a massa anotada (M_2).

Destruição ácida (AD)

Após análise da FDA, cada saco foi mergulhado em um frasco com tampa contendo 40 mL de ácido sulfúrico a 72%. As amostras reagiram por 3 horas sendo posteriormente lavadas com água destilada em abundância

Os sacos foram então transferidos para os béqueres anteriormente pesados e colocados para secar em estufa de ar forçado a 105°C por 24 horas, sendo posteriormente pesados (M_3). Após esta etapa, os béqueres foram transferidos para uma mufla a 550°C por 2 horas sendo posteriormente pesados após atingir a temperatura ambiente (M_4).

3. Cálculos

Cálculo dos resíduos:

Foi utilizado um fator de correção para a massa do saco (99,2% da massa do saco é queimada durante a transição a 550°C).

$$FDN = \frac{M_1 - M_4 - 0,992 \times (TS - T)}{(MI - TS) \times MS \times MO} \quad \text{XVI-1}$$

$$FDA = \frac{M_2 - M_4 - 0,992 \times (TS - T)}{(MI - TS) \times MS \times MO} \quad \text{XVI-2}$$

$$AD = \frac{M_3 - M_4 - 0,992 \times (TS - T)}{(MI - TS) \times MS \times MO} \quad \text{XVI-3}$$

T: massa do béquer, em g

TS: massa do béquer + saco, em g

MI: massa do béquer + amostra + saco, em g

M₁: massa após extração e secagem por FDN, em g

M₂: massa após extração e secagem por FDA, em g

M₃: massa após extração e secagem por AD, em g

M₄: pesagem após a queima na mufla, em g

MO: matéria orgânica

MS: matéria seca

Cálculo das frações:

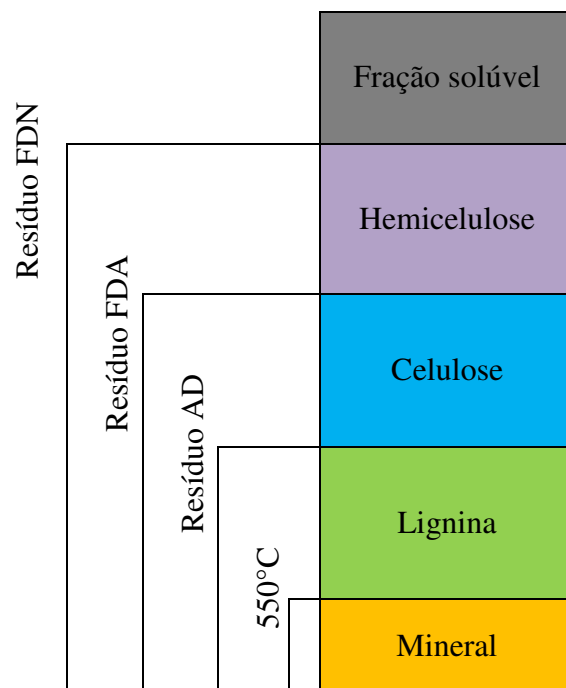
A partir dos resíduos, pode-se calcular as quantidades representadas de cada fração da biomassa:

Fração solúvel = 1-FDN

Hemicelulose = FDN-FDA

Celulose = ADF-AD

Lignina = AD



APÊNDICE XVII

DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE BIOGÁS PRODUZIDO

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Mesure du potentiel methane et estimation de la biodegradabilite anaerobie” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (BUFFIERE *et al.*, 2006). O objetivo é determinação do volume de biogás produzido através de sua medida pelo deslocamento vertical da água.

4. Determinação do volume de biogás

Para a determinação do volume de biogás produzido diariamente, mediu-se o deslocamento vertical do gasômetro, que tinha área da seção transversal interna de 0,0507 m². Após cada leitura, o gasômetro era zerado, utilizando-se do registro de descarga do biogás. A correção do volume de biogás para as condições de 1 atm e 35°C foi efetuada levando em consideração o fator de compressibilidade (Z), assumindo assim que o biogás apresenta um comportamento próximo ao de um gás ideal.

O volume do biogás foi determinado após leitura da sua porcentagem de metano por cromatografia a gás, de acordo com a metodologia descrita no *apêndice XVIII*.

$$V_{BP} = V_0 \times \left(\frac{\%CH_{4n} - \%CH_{4n-1}}{100} \right) + \frac{V_B \times \%CH_{4n}}{100} \quad \text{XVII-1}$$

V_{BP} : Volume de biogás produzido, mL

V_0 : volume do espaço vazio do reator

$\%CH_{4n}$: porcentagem de gás metano obtida por cromatografia

%CH_{4 n-1}: porcentagem de gás metano obtida por cromatografia na leitura anterior

V_B: volume de biogás medido pelo deslocamento do gasômetro

Para a correção do volume de biogás, utilizou-se a expressão resultante da combinação das leis de Boyle e Gay-Lussac:

$$V_{CB} = \frac{V_{BP} \times 273,15}{T_{gás}^0 + 273,15} \quad \text{XVII-2}$$

V_{CB} - volume de biogás corrigido, mL

V_{BP}: Volume de biogás produzido, mL

T_{gás}⁰- temperatura corrigida do biogás, 35°C

APÊNDICE XVIII

DOSAGEM DOS GASES CO₂, O₂, N₂ E CH₄ POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Dosages des gaz CO₂, N₂O, H₂, O₂, N₂, CH₄ par GC-catharomètre avec le GC14” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (CARRERE *et al.*, 2005). O objetivo foi quantificar os gases CO₂, O₂, N₂, CH₄ por cromatografia gasosa.

1. Equipamento e materiais

Para a quantificação de cada um dos constituintes presentes no biogás, foi utilizado o cromatógrafo a gás como descrito:

- Cromatógrafo Shimadzu GC14 equipado com condutividade térmica (TCD célula tipo de bloco P 100 ohm) e integrador Shimadzu CR8A,
- Septos Thermogreen LB-2 (Supelco 20633),
- Coluna CTR I (ref Alltech 8700)
 - Formado por duas colunas concêntricas: a coluna interna de 1/8" permite separar o N₂O e CO₂ dos outros gases. A coluna externa 1/4" é equipada com uma peneira molecular que separa os gases O₂, N₂, H₂ e CH₄.
 - Temperatura máxima: 275°C
 - Regeneração: 250°C durante a noite.
- Gás de arraste: Argônio
- Seringas descartáveis com agulhas de diâmetro 0,3 a 0,5.

2. Procedimento

Após retirada de todo o biogás presente em cada um dos reatores, como descrito no *apêndice XVI*, a seringa conectada ao cromatógrafo à gás foi inserida no reator, sendo injetado 1,0 mL do biogás produzido. Através do software de integração, a composição do biogás foi determinada.